

Université de Sherbrooke

**AMPLIFICATION PAR LES ESTROGÈNES D'UNE RÉSISTANCE AU
MÉTHOTREXATE CHEZ LES CELLULES CANCÉREUSES DU SEIN**

par Paul A.Thibodeau

Département de médecine nucléaire et de radiobiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.)

novembre 1997



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-40627-X

‘Patience et persévérance seront toujours récompensées.’
Albert Einstein

A mes parents, Normand et Paulette Thibodeau, qui m’ont donné
le désir d’apprendre et de découvrir.

REMERCIEMENTS

Je désire d'abord remercier très sincèrement le Dr. Benoit Paquette pour son excellente supervision et ses conseils indispensables à mon apprentissage et à mon épanouissement scientifique. Je remercie aussi le Dr. Johan E. Van Lier pour sa co-direction.

Ma reconnaissance va également à Suzanne Kocsis-Bédard, dont l'expérience et le travail hors de pair m'ont été d'une aide inestimable dans le succès de ce mémoire.

Mes plus sincères remerciements vont également à Nathalie Bissonnette, Dr. Darel Hunting, Dr. André Cantin, et Dr. Claude Asselin, dont les collaborations ont été grandement appréciées.

Je tiens à remercier aussi de tout cœur mes amis étudiants-chercheurs Nathalie, Badia, Isabelle, Éric, Pascale et Jean-René, ainsi que ma petite sœur Lucie pour leur amitié, leur patience et leur compréhension tout au cours de mes études de maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABRÉVIATIONS

RÉSUMÉ

I. INTRODUCTION.....	1
1. Description du projet de recherche.....	1
2. Estrogènes et cancer du sein.....	3
2.1 Estrogènes et prolifération cellulaire	
2.2 Épidémiologie du cancer du sein	
2.3 Facteurs de risque	
3. Récepteurs des estrogènes (ER).....	8
3.1 Domaines du gène ER	
3.2 Migration vers l'ADN	
3.2.1 Dissociation des protéines de choc thermique	
3.2.2 Dimérisation des récepteurs	
3.2.3 Doigts de zinc	
3.2.4 Protéines accessoires au récepteur des estrogènes	
3.3 Marqueur hormonal <i>pS2</i>	
4. Métabolisme des estrogènes.....	17
4.1 Oxydations métaboliques	
4.2 Métabolites de l'estradiol	
4.2.1 16 α -hydroxylation	
4.2.2 Catécholestrogènes	
4.3 Cycle rédox des estrogènes	
5. Stress oxydatif et cancer.....	25
5.1 Espèces réactives de l'oxygène	
5.1.1 Le radical hydroxyle	
5.1.2 L'anion superoxyde	
5.1.3 Le peroxyde d'hydrogène	
5.2 La réaction de Fenton	

6. Mécanismes de défense contre les dommages oxydatifs.....	30
6.1 Superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase	
6.2 Glutathion	
7. L'agent chimiothérapeutique méthotrexate.....	34
7.1 Résistance au méthotrexate (MTX)	
7.1.1 Structure et mécanisme d'action du méthotrexate	
7.1.2 Mécanismes de résistance au méthotrexate	
7.2 Amplification	
7.2.1 Amplification du gène <i>dihydrofolateréductase (dhfr)</i>	
7.2.2 Le gène <i>dhfr</i>	
8. Le gène suppresseur de tumeurs <i>p53</i>	41
8.1 Structure du gène <i>p53</i>	
8.2 Structure de la protéine p53	
8.3 Rôle du p53	
8.3.1 Réparation de l'ADN	
8.3.2 p53 et mdm-2	
8.3.3 Cycle cellulaire et p21	
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	48
1. Modèle cellulaire et conditions de culture.....	48
1.1 Modèle cellulaire	
1.2 Traitement au Dextran-Coated Charcoal	
1.3 Dialyse	
2. Détermination du LD ₅₀ (Lethal Dose 50).....	50
3. Détermination du taux de mutation induisant une résistance au méthotrexate par essai Luria-Delbrück.....	50
3.1 Essai Luria-Delbrück	
3.2 Efficacité de clonage	
4. Préparation des fragments d'ADN pour les sondes radioactives.....	53
5. Détermination de l'amplification du gène <i>dhfr</i>	54
5.1 Extraction d'ADN	
5.2 Transfert Southern	
5.3 Hybridation	

6. Activation de la transcription du gène <i>pS2</i> par les estrogènes.....	57
6.1 Extraction de l'ARN total	
6.2 Transfert Northern	
6.3 Hybridation	
7. Détermination de la concentration du glutathion	59
7.1 Mesure du glutathion	
7.2 Dosage protéique	
8. Détermination du statut du gène suppresseur de tumeur <i>p53</i>	61
8.1 Irradiation et préparation de l'extrait cellulaire	
8.2 Électrophorèse et transfert Northern	
8.3 Anticorps	
III. RÉSULTATS.....	63
1. Amplification d'une résistance au méthotrexate par les estrogènes.....	63
2. Amplification génique du <i>dhfr</i> chez les clones MTX-résistants induits par les estrogènes.....	68
3. Induction du <i>pS2</i>	69
4. Implication des espèces réactives de l'oxygène dans la résistance au méthotrexate.....	71
5. Statut du gène suppresseur de tumeur <i>p53</i>	74
IV. DISCUSSION.....	80
1. Amplification d'une résistance au méthotrexate par les estrogènes	80
2. Implication du récepteur des estrogènes.....	82
3. Implication des espèces réactives de l'oxygène dans la résistance au méthotrexate.....	85
4. Statut du gène suppresseur de tumeur <i>p53</i>	89
V. CONCLUSION.....	92
RÉFÉRENCES.....	94

LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1.** Vue latérale d'une coupe sagittale du sein
- FIGURE 2.** Nombre d'acides aminés du récepteur des estrogènes
- FIGURE 3.** Domaines du récepteur des estrogènes
- FIGURE 4.** Mécanisme d'action des stéroïdes
- FIGURE 5.** Doigts de zinc du récepteur des estrogènes
- FIGURE 6.** Biosynthèse des stéroïdes
- FIGURE 7.** Métabolites de l'estradiol
- FIGURE 8.** Adduit 16 α -hydroxyestrone
- FIGURE 9.** Formation des catécholestrogènes
- FIGURE 10.** Cycle rédox des estrogènes
- FIGURE 11.** Métabolisme, cycle rédox et dommages par les estrogènes
- FIGURE 12.** Cycle rédox des estrogènes et réaction de Fenton (Cu)
- FIGURE 13.** Structure du GSH
- FIGURE 14.** Métabolisme du GSH
- FIGURE 15.** Structures de l'acide folique et du méthotrexate
- FIGURE 16.** Mécanisme d'action du MTX
- FIGURE 17.** Schéma possible des étapes conduisant à la formation des chromosomes minutes (DM) et des régions chromosomiques étendues (HSR)
- FIGURE 18.** Le gène *dhfr*
- FIGURE 19.** Les 11 exons du gène *p53*
- FIGURE 20.** Structure et domaines de la protéine p53
- FIGURE 21.** Dommage à l'ADN et p53

FIGURE 22. Boucle entre p53 et mdm-2

FIGURE 23. Contrôle du cycle cellulaire par les complexes cdk-cyclines

FIGURE 24. Diagramme illustrant l'analyse Luria-Delbrück

FIGURE 25. Diagramme illustrant l'analyse Luria-Delbrück

FIGURE 26. Illustration de colonies MTX-résistantes après exposition au 2-hydroxyestrone ou l'éthanol (0.01%) effectué par essai Luria-Delbrück

FIGURE 27. Amplification du gène *dhfr* par les estrogènes

FIGURE 28. Stimulation du niveau d'ARNm du *pS2*

FIGURE 29. Niveau relatif du marqueur hormonal pS2 induit par l'estradiol et ses métabolites

FIGURE 30. Stimulation du glutathion (GSH) chez le clone MTX^R-2OHE₁-1

FIGURE 31. Illustration des niveaux de p53 et de p21 induits selon une échelle d'irradiation UVB allant de 0 à 700 J/m²

FIGURE 32. Stimulation de l'expression de *p53* par les irradiations (UVB et γ) et l'estradiol

FIGURE 33. Gène *p53* chez les clones résistants au MTX: Détermination de son statut et effets des estrogènes

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ARE : élément de réponse antioxydant

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATCC : American Type Cell Culture

ATP : adénosine triphosphate

bp : paire de bases

BRCA1 : BReast CAncer gene 1

BRCA2 : BReast CAncer gene 2

BSA : albumine de sérum bovin

BSO : buthionine sulfoximine

°C : degré Celsius

C2 : carbone 2

C4 : carbone 4

CAD : carbamylphosphate synthétase/aspartate transcarbamylase/dihydroorotase

Cdk : kinase dépendante des cyclines

cDNA : ADN complémentaire

CE : catécholestrogènes

cGy : centigray

Cl : chlore

cm : centimètre

⁶⁰Co : cobalt-60

COMT : catéchol-o-méthyltransférase

cpm : comptes par minute

C-terminal : carboxy-terminal

Cu : cuivre

DCC : Dextran-Coated Charcoal

dCTP : désoxycytidine triphosphate

dhfr : *dihydrofolate réductase*

DM : double-minute

dTMP : désoxythymidine monophosphate

DTNB : acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque

dUMP : désoxyuridine monophosphate

E₁ : estrone

E₂ : estradiol

ECR : Expanded Chromosome Region

EDTA : disodium éthylènediamine tétraacétate

ER : récepteur des estrogènes

ERE : élément de réponse estrogénique

ERO : espèces réactives de l'oxygène

FBS : Fœtal Bovine Serum

Fe : fer

fmol : femtomole

FH₂ : 7,8-dihydrofolate

FH₄ : 5,6,7,8-tétrahydrofolate

G1 : gap-1

G2 : gap-2

γ -GCS : γ -glutamylcystéine synthétase

GPx : glutathion peroxydase

GR : glutathion réductase

GSSG : glutathion oxydé

GSH : glutathion réduit

h : heure

H : hydrogène

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

hsp90 : heat-shock protein 90

HSR : Homogeneously Staining Region

I κ B : sous-unité inhibitrice kappa-B

J/m² : joule par mètre carré

Kbp : kilo paire de bases

KD : kilodalton

Kg : kilogramme

LD₅₀ : Lethal Dose 50

2-MeOHE₁ : 2-méthoxyestrone

μg : microgramme

mg : milligramme

μl : microlitre

ml : millilitre

mM : millimolaire

M : molaire

mdm-2 : murine double minute-2

MEM : Minimal Essential Medium

MOPS : acide sulfonique 3-(-N-Morpholino) propane

MTX : méthotrexate

Na : sodium

NaCl : chlorure de sodium

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide oxydé

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

NADP⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé

NaOH : hydroxyde de sodium

NF-κB : nuclear factor kappa-B

NIH : National Institute of Health

nm : nanomètre

nM : nanomolaire

O₂ : oxygène moléculaire

O₂^{•-} : anion superoxyde

OH : hydroxyle

OH[•] : radical hydroxyle

OHE₁ : hydroxyestrone

2-OHE₁ : 2-hydroxyestrone

4-OHE₁ : 4-hydroxyestrone

16 α -OHE₁ : 16 α -hydroxyestrone

P³² : phosphore 32

p100 : boîte de Pétri 100 mm²

p150 : boîte de Pétri 150 mm²

P450 : Pic 450 nm

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis

PALA : N-phosphonoacétyl-L-aspartate

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PMSF : phénylméthylsulfonyl de fluorure

Rb : retinoblastoma

rpm : révolutions par minute

SDS : dodécyl sulfate de sodium

sec. : seconde

SHBG : Sex Hormone Binding Globulin

SOD : superoxyde dismutase

ssDNA : single-strand DNA

TAF-1 : Transcriptional Activation Function-1

TAF-2 : Transcriptional Activation Function-2

TBP : TATA-binding protein

TFIID : Transcription factor II D

TFIIH : Transcription factor II B

Tris : tris (hydroxyméthyl) aminométhane

UVB : rayons UV-B

V : volts

AMPLIFICATION PAR LES ESTROGÈNES D'UNE RÉSISTANCE AU MÉTHOTREXATE CHEZ LES CELLULES CANCÉREUSES DU SEIN

par Paul A. Thibodeau

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

Le génome des cellules cancéreuses est instable, ce qui permet l'accumulation de modifications dans l'ADN à un taux plus rapide que chez les cellules normales. Une étude précédente a démontré que ce phénotype d'instabilité peut être amplifié chez les cellules tumorigènes par l'estradiol (E_2), alors que le génome de cellules normales n'était pas affecté. Afin de déterminer l'importance de cette amplification de l'instabilité génomique par les estrogènes, une série d'expériences a été mis au point permettant d'évaluer si le E_2 et ses principaux métabolites 2-, 4- et 16 α -hydroxy-estrone (-OHE₁) peuvent stimuler le développement d'une résistance au méthotrexate (MTX) chez la lignée cellulaire cancéreuse du sein MCF-7. Ces cellules ont été incubées avec les estrogènes à une concentration de 10^{-8} M pendant 12 générations cellulaires. Les plus efficaces ont été le 4-OHE₁ et 16 α -OHE₁ stimulant l'apparition de MCF-7 MTX-résistantes au même niveau, i.e. 88 fois par rapport au contrôle. Le 2-OHE₁ démontrait aussi un bon potentiel avec un facteur d'amplification de 33 fois, alors que le E_2 n'a qu'un faible effet de 3.2 fois. Les données obtenues avec le 16 α -OHE₁ et le E_2 suggèrent que ce développement d'une résistance au MTX peut impliquer le récepteur des estrogènes (ER) tel que détecté par la stimulation du gène *pS2*, un marqueur de l'activité estrogénique; alors que les catécholestrogènes (CE: 2- et 4-OHE₁) ne stimulent pas le *pS2*, suggérant qu'ils agissent par un mécanisme indépendant de la voie du ER. Il est connu que les CE peuvent générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par un cycle rédox et ainsi initier des modifications dans l'ADN. Le niveau de l'antioxydant glutathion (GSH) a été mesuré chez le clone MTX-résistant induit par le 2-OHE₁ et incubé de nouveau en présence du 2-OHE₁ afin de vérifier si ce CE génère réellement un stress oxydatif. Une induction du niveau du GSH de 2.07 fois a été obtenue avec le 2-OHE₁ comparativement au 2-méthoxyestrone, métabolite inactif du 2-OHE₁. Une inhibition de la synthèse du GSH avec le buthionine sulfoximine conjuguée à une exposition au 2-OHE₁ a augmenté l'apparition d'une résistance au MTX de 427.8 fois, comparativement à 33 fois pour le 2-OHE₁ seul. Les métabolites CE semblent donc amplifier cette résistance par la formation de ERO. L'exposition aux estrogènes a aussi altéré le comportement d'un gène important pour la stabilité du génome, soit le gène suppresseur *p53*. En effet, le niveau basal du *p53* était amplifié chez tous les clones MTX-résistants. Ce niveau était augmenté de 10 fois suivant l'addition du 2-OHE₁ mais sans stimulation de *p21*, le qualifiant ainsi d'inactif. En conclusion, la résistance aux agents chimiothérapeutiques est un facteur majeur limitant l'efficacité des traitements anticancéreux. L'inhibition de cette résistance induite par les estrogènes à l'aide d'antiestrogènes et/ou d'antioxydants pourrait améliorer le sort des patientes atteintes du cancer du sein.

I. INTRODUCTION

1. Description du projet de recherche

Le développement d'une résistance aux agents chimiothérapeutiques est un facteur majeur limitant l'efficacité des traitements anticancéreux. Le génome des cellules cancéreuses étant instable, de nouvelles modifications à l'ADN s'accumulent à un taux plus rapide que chez les cellules normales (Loeb, 1991), un phénomène appelé instabilité génomique. Lorsque des modifications appropriées à l'ADN apparaissent, ces cellules cancéreuses peuvent acquérir un avantage comparativement à celles n'ayant pas eues de modifications génomiques, pouvant mener à la résistance aux traitements chimiothérapeutiques.

Parmi les candidats potentiels comme agents pouvant amplifier l'instabilité génomique, l'estradiol a été récemment suggéré (Paquette, 1996). Le rôle des estrogènes comme agents causals du cancer du sein est déjà connu (Henderson et al., 1988). Récemment, il a été démontré que l'estradiol peut aussi stimuler le phénotype de l'instabilité génomique, tel que détecté par l'apparence de nouveaux réarrangements génomiques dans des séquences minisatellites chez des cellules tumorigéniques (Paquette, 1996). Cet effet de l'estradiol était spécifique aux cellules tumorigéniques puisque l'hormone n'a pas induit de nouveaux réarrangements à l'ADN chez les cellules non-tumorigéniques. Il a aussi été démontré chez des cellules MCF-7 déjà résistantes au méthotrexate (MTX), isolées après une sélection avec des concentrations ascendantes de MTX (step-wise selection), le niveau basal du gène *dihydrofolate*

réductase (dhfr) déjà élevé pouvait être augmenté encore plus en incubant ces cellules en présence de l'estradiol à une concentration physiologique (10^{-8} M) (Cowan et al., 1982; Levine et al., 1985). Toutefois, même si la présence de l'estradiol peut modifier la réponse au MTX chez des cellules déjà résistantes, l'implication de cette hormone et de ces principaux métabolites dans le développement d'une résistance au MTX avant l'exposition au MTX n'est toujours pas documentée.

Afin de répondre à cette question, nous avons voulu déterminer dans un premier temps si l'estradiol et ses principaux métabolites, le 2-, 4- et 16 α -hydroxyestrone, peuvent induire l'apparition de cellules résistantes au MTX. Nous voulions aussi vérifier si cette résistance était due à une amplification du gène *dhfr*; et si cette résistance était reliée à l'activation de gènes dépendants des estrogènes, en utilisant le gène rapporteur *pS2*, dont l'expression est spécifiquement activée par l'estradiol. En mesurant le niveau de l'antioxydant intracellulaire glutathion, nous avons voulu investiguer le rôle des espèces réactives de l'oxygène (ERO) générés par les métabolites catécholestrogènes de l'estradiol dans le développement d'une résistance au MTX. Finalement, nous avons voulu déterminer le statut du gène suppresseur de tumeurs *p53* pour vérifier si une modulation de ce dernier est reliée à une résistance au MTX amplifiée par les estrogènes.

2. Estrogènes et cancer du sein

Il est maintenant bien connu que les estrogènes sont impliquées dans l'apparition du cancer du sein (Henderson et al., 1988). Il existe deux écoles différentes dans l'attribution d'un rôle qu'exercent les estrogènes dans cette implication: celle où les estrogènes stimulent la prolifération cellulaire, augmentant ainsi la probabilité qu'une mutation se fixe; et celle où le métabolisme des estrogènes amènent la formation des métabolites catécholestrogènes qui sont impliqués dans la génération d'espèces réactives de l'oxygène pouvant endommager l'ADN, via un cycle rédox. Il est donc essentiel de s'attarder un peu sur la voie hormonale qui implique le récepteur des estrogènes (ER), et le métabolisme des estrogènes impliquant un cycle rédox ainsi que les diverses espèces radicalaires formés par ceux-ci.

2.1 Estrogènes et prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire requiert la réception de signaux extracellulaires qui sont traduits en signaux intracellulaires. Ces signaux intracellulaires déclenchent une cascade d'événements culminants éventuellement à la mitose. Des altérations dans une ou plusieurs de ces étapes peuvent causer la dérégulation de la prolifération cellulaire (McKenzie, 1996).

Il a été proposé que les estrogènes sont carcinogéniques dû à leur habilité de stimuler la prolifération cellulaire des cellules épithéliales du tissu mammaire

(Preston-Martin et al., 1990) Ces cellules recouvrent les cavités glandulaires, ou acini, et les galactophores par lesquels s'écoulent le lait.

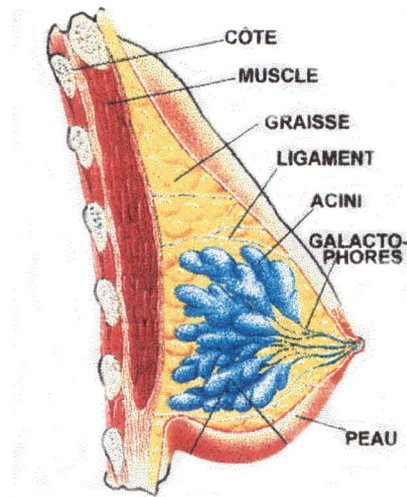


Figure 1. Vue latérale d'une coupe sagittale du sein.
Lee Davis D., Bradlow L. (1995) Pour la science 218: 74-80

L'hormone modifie la croissance cellulaire en se liant à une protéine intracellulaire nommée récepteur des estrogènes. Le complexe constitué par l'hormone et son récepteur se lie à l'ADN et active des gènes qui commandent la division cellulaire (Lee Davis et Bradlow, 1995). En accélérant la vitesse de réplication de l'ADN, ceci peut faciliter la carcinogénèse en favorisant la fixation des mutations spontanées et induites par les carcinogènes, ou en allouant l'expansion clonale de cellules pré-néoplasiques (Barrett, 1993).

2.2 Épidémiologie du cancer du sein

Il est bien connu que les hormones ovariennes jouent un rôle crucial dans toutes les étapes du développement du cancer du sein. Les deux hormones ovariennes majeures, l'estradiol et la progestérone, augmentent le risque de développer un cancer

du sein (Pike, 1993). Il a été établi qu'une femme sur neuf risque de développer un cancer du sein au cours de sa vie. En 1996, 184 300 nouveaux cas et 44 300 décès ont été décelés aux États-Unis; plaçant le cancer du sein comme troisième cause de mortalité après les maladies cardio-vasculaires et le cancer du poumon (Cameron, 1990).

2.3 Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque pouvant être impliqués dans le cancer du sein ont été suggérés, voici brièvement les plus importants :

Ménarche et Ménopause

Les femmes qui ont eu leurs premières règles très jeunes et une ménopause tardive ont un risque plus élevé de développer un cancer du sein. Ceci peut être simplement relié à une plus longue exposition aux estrogènes.

Grossesse

L'effet de la reproduction sur le cancer du sein demeure incompris, mais certaines données suggèrent que la grossesse a un effet sur la biodisponibilité des estrogènes (Bernstein et Ross, 1993). Deux études ont démontré que la capacité de liaison des SHBGs (Sex Hormone Binding Globulin) chez les femmes préménopausées ayant donné naissance est 10 à 12% plus élevée que chez les femmes préménopausées n'ayant eu aucune grossesse, suggérant ainsi que les estrogènes libres

atteignent plus facilement le récepteur des estrogènes chez ces femmes préménopausées (Moore et al., 1987; Bernstein et al., 1985).

En plus, certains suggèrent que la grossesse diminue les probabilités d'obtenir un cancer du sein dû à une différenciation des cellules épithéliales du sein causée par la forte concentration des estrogènes présents pendant cette période. La différenciation des cellules épithéliales du sein diminue aussi la probabilité que ces cellules puissent fixer une mutation.

Obésité

L'obésité mène à une augmentation de la production périphérique d'estrone à partir de l'androstenedione, puisque les cellules adipeuses sont riches en aromatase, un enzyme nécessaire pour cette conversion (Siiteri et MacDonald, 1973). L'obésité est fortement associée avec une production diminuée de SHBG, ce qui augmente les proportions d'estradiol libre et lié à l'albumine (Moore et al., 1987). Alors, une plus grande biodisponibilité des estrogènes ainsi qu'une production diminuée de SHBG peuvent agir en synergie; ce qui expliquerait la relation entre l'obésité et le risque de développer un cancer du sein.

Situation géographique

Key et al. (1990) ont conduit une étude chez des femmes âgées entre 35 et 64 ans de régions ruraux de la Chine, où le taux de cancer du sein est extrêmement faible. Ces résultats ont été comparés avec le profil hormonal de femmes britanniques à haut risque. Parmi les femmes préménopausées âgées entre 35 et 44 ans, les femmes

britanniques avaient des concentrations d'estradiol 36 fois plus élevées, en moyenne, que celles des Chinoises. Il a été proposé que ceci pourrait être partiellement expliqué par une fréquence réduite d'ovulations, et une formation moins efficace du corps jaune chez les Chinoises. Les différences dans la diète et de la dépense d'énergie pourraient créer ces différences ovulatoires ou contribueraient directement aux différences estrogéniques (Bernstein et Ross, 1993).

Histoire familiale

On estime que 5% des cancers du sein sont d'origine génétique. En décembre 1990, grâce à la collaboration de familles comptant plusieurs cas de cancer du sein, le groupe de Mary-Claire King, de l'Université de Berkeley, localise sur le chromosome 17 un premier gène dont l'altération est à l'origine d'une prédisposition à ce cancer: BRCA1 (BREast CAncer 1) (Hall et al., 1990). Quatre ans plus tard, le groupe de Michael Stratton et Richard Wooster, de l'Institut de la Recherche sur le cancer de Sutton (Grande-Bretagne), localise un second gène de susceptibilité, BRCA2, sur le chromosome 13 (Wooster et al., 1994).

L'histoire familiale du cancer du sein, particulièrement lorsque le diagnostic est effectué chez la mère ou la sœur à un jeune âge peut être un facteur de risque important pour le cancer du sein. Pour une femme qui a une sœur ayant eue un cancer du sein bilatéral avant l'âge de 50 ans, le risque cumulatif du cancer du sein au cours de sa vie semble être plus grand que 50%, et ce risque est encore plus élevé si cette sœur est atteinte avant l'âge de 40 ans (Harris et al., 1992).

3. Récepteur des estrogènes

Les estrogènes, comme mentionné précédemment, sont les régulateurs principaux de la croissance et de la différenciation du tissu mammaire normal, et sont considérés comme des joueurs importants dans le développement et la progression du cancer du sein.

Les récepteurs des estrogènes (ER) sont des protéines sur lesquelles se lie l'estradiol, l'estrogène le plus potentiellement et biologiquement actif au niveau de la prolifération cellulaire, avec une grande spécificité et affinité. La présence des récepteurs des estrogènes semble être nécessaire pour obtenir une réponse du tissu cible à une stimulation estrogénique. Les conséquences de l'interaction estradiol-ER incluent la synthèse de l'ADN, la division cellulaire, la production de protéines biologiquement actives, incluant les facteurs de croissance et les récepteurs à la progestérone (Habel et Stanford, 1993).

Plusieurs travaux de recherche (Engelsman et al., 1973; Leung et al., 1973; Maass et al., 1972; Maas et Trams, 1973; Savlov et al., 1974) indiquent que la présence et la concentration des récepteurs des estrogènes chez la tumeur primaire sont positivement associées avec la réponse à la thérapie hormonale, et que cette réponse est améliorée lorsque les tumeurs sont positives pour les récepteurs des estrogènes ainsi que ceux à la progestérone (Jensen, 1980).

Les tumeurs ayant des récepteurs des estrogènes négatifs ont été caractérisées comme étant moins différenciées et ayant un taux de prolifération plus grand (Winstanley, 1991). Les tumeurs ayant des ER-négatifs ont aussi démontré une

correlation faible à une thérapie antiestrogénique comparativement aux ER-positifs (Lee, 1979).

3.1 Domaines du ER

Le gène du récepteur des estrogènes a été localisé sur le bras long du chromosome 6 (Kumar et al., 1987) et sa structure détaillée des exons et des introns du gène ER est connue (Ponglikitmongkol et al., 1988).

Le récepteur des estrogènes est formé de 595 acides aminés (Evan, 1988)

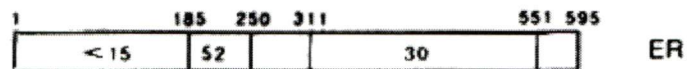


Figure 2. Nombre d'acides aminés du récepteur des estrogènes
 Evans, R.M. (1988) Science 24: 889-895

et il contient plusieurs régions fonctionnelles majeures: un domaine N-terminal A/B, un domaine C (domaine de liaison à l'ADN), un domaine D (hinge), un domaine E (domaine de liaison de l'hormone), et un domaine F (Pike, 1993; Fuller, 1991; Tsai et O'Malley, 1994).

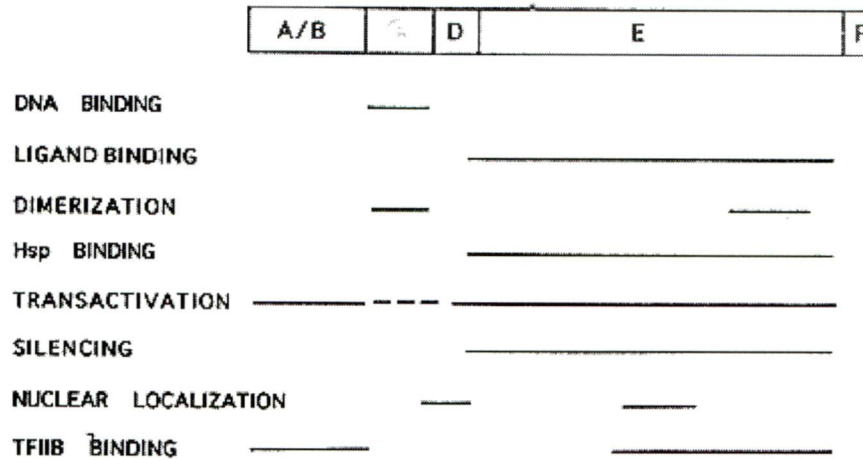


Figure 3. Domaines du récepteur des estrogènes

Tsai M.J., O'Malley B.W. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* 63: 451-486

Le modèle classique pour le mode d'action des stéroïdes propose que la liaison du ligand au récepteur induit un changement allostérique qui permet au complexe hormone-récepteur de se lier à des éléments de réponse sur l'ADN au niveau du promoteur d'un gène cible. C'est cette liaison qui mène à l'activation de l'expression génique. Il paraît que le domaine de liaison de l'hormone prévient normalement le domaine de liaison à l'ADN d'activer la transcription, c'est apparemment l'addition de l'hormone qui supprime cette inhibition (Evan, 1988) ainsi que l'inhibition d'une protéine répresseuse SSN6. Cette protéine empêche la transactivation de gène par le récepteur, mais la liaison du ligand à son récepteur réprime cette fonction du SSN6 (McDonnell et al., 1992).

Le domaine de liaison à l'ADN (région C) des récepteurs nucléaires contient deux ions zinc qui sont coordonnés tétrahédriquement par huit résidus cystéines. La

coordination de zinc est importante pour l'intégrité structurale et la fonction de liaison à l'ADN du domaine de liaison à l'ADN. Le domaine de liaison à l'ADN interagit avec des éléments de réponse estrogéniques dans les régions régulatrices de gènes spécifiques (Fuller, 1991; Ziliacus et al., 1995)

La région D (hinge) contient des séquences qui sont critiques à la localisation du récepteur protéique au noyau après qu'il est été synthétisé dans le cytoplasme (Pike, 1993).

Il est aussi connu que deux régions localisées dans les domaines du ER sont directement impliqués dans l'activation de la transcription génique inductible par les estrogènes. La région TAF-1 (Transcriptional Activation Function-1) située dans le bout N-terminal est un domaine de transactivation indépendant de l'hormone. Et, la région TAF-2 (Transcriptional Activation Function-2) située au bout C-terminal dans le domaine de liaison à l'hormone est un site de transactivation dépendant de l'hormone (Lemieux et Fuqua, 1996; Tora et al., 1989; Danielan et al., 1992; Tsai et O'Malley, 1994).

3.2 Migration du ER vers l'ADN

Afin d'avoir une action, les hormones doivent initialement se lier à leur récepteur, formant ainsi un complexe hormone-récepteur. Ce complexe doit ensuite migrer à l'intérieur du noyau vers l'ADN afin de transactiver des gènes spécifiques. Pour que ceci se réalise, des protéines liées sur le récepteur nommées protéines de choc thermique, se dissocient de celui-ci et deux récepteurs se dimérisent pour ensuite se lier sur des séquences nucléotidiques spécifiques nommées éléments de réponse estrogénique.

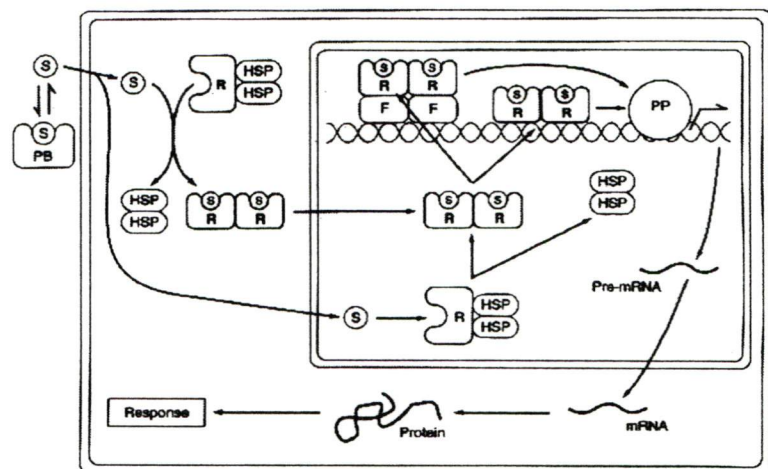


Figure 4. Mécanisme d'action des stéroïdes
Greenspan F.S., Baxter J.D. (1994)
Basic and Clinical Endocrinology

S= Stéroïde
PB= Plasma binding protein
HSP= Heat-Shock Protein
R= Récepteur
F= Facteur de transcription
PP= Protéines de liaison du promoteur

3.2.1 Dissociation des protéines de choc thermique

Les protéines de choc thermique sont qualifiées par les spécialistes de ce champ de recherche comme étant des chaperons moléculaires. Les chaperons

moléculaires sont définis comme une famille de protéines qui assure l'assemblage correcte d'autres polypeptides mais qui ne sont pas des composantes de la structure fonctionnelle finale (Ellis et Van der Vies, 1991).

Le récepteur lié aux chaperons est stabilisé dans un état qui a une grande affinité pour l'hormone, mais qui ne peut pas se lier à l'ADN. L'activation des récepteurs liés aux hsp90 (heat-shock proteins 90) par l'addition d'un ligand (i.e. les estrogènes) est une réaction nécessitant l'ATP qui implique: la liaison du ligand, la dissociation des hsp90, et un changement de conformation du récepteur en une forme qui a une grande affinité pour l'ADN (Hendrick et Hartl, 1993; Pratt, 1990; Chambrud et al., 1990; Bohen et al., 1995).

3.2.2 Dimérisation des récepteurs

Le récepteur des estrogènes doit se dimériser afin d'activer efficacement la transcription. Les éléments de réponse pour les estrogènes consistent en des séquences répétitives inversées dans lesquelles deux demi-sites (half-sites) sont séparées par 3 paires de bases (bp).

Puisque les éléments de réponse estrogénique sont basés sur une séquence palindromique et ont une symétrie rotationnelle, il a été suggéré que les récepteurs des estrogènes se lient à l'ADN comme dimères protéiques. (Kumar et al., 1987; Fawell et al., 1990; Kumar et Chambon, 1988).

3.2.3 Doigts de zinc

Une partie essentielle de l'expression génique et de sa régulation est la liaison d'une protéine régulatrice (e.g. le ER) à une séquence de reconnaissance d'un gène approprié (e.g. le ERE). Plusieurs de ces protéines ont, encastré dans leurs structures, un domaine (ou motif) qui sert à la liaison du récepteur à l'ADN (Klug et Rhodes, 1987).

En 1985, l'équipe de Klug à Cambridge en Angleterre ont identifié un motif structural pour la reconnaissance de l'ADN, nommé doigt de zinc (Miller et al., 1985). Klug proposait initialement que les paires d'acides aminés cystéines et histidines dans chaque module se combineraient avec un seul ion zinc, amenant les acides aminés entre ces paires à se replier. En même temps, trois acides aminés hydrophobiques permettraient de stabiliser l'arrangement (Rhodes et Klug, 1993).

Les deux doigts de zinc présents chez le récepteur des estrogènes contiennent deux paires d'acides aminés cystéines chacun, plutôt qu'une paire de cystéines et une paire de histidines de la structure initiale découverte par Klug. La première unité doigt de zinc fait le contact principal

estrogènes, est liée spécifiquement à la région TAF-2 du domaine de liaison de l'hormone du ER. Il semble que la ERAP160 reconnaît seulement la conformation active du ER. Leurs données suggèrent que la ERAP160 peut être un médiateur de la transactivation-dépendante de TAF-2 par le récepteur des estrogènes.

D'autres protéines récemment découvertes ont été identifiées comme accessoires aux ER, telles que les ERAP140, ERAP80 ainsi que SPT6; mais il est toutefois difficile de définir présentement la fonction de ces protéines accessoires aux ER (Cavaillès et al., 1994; Baniahmad et al., 1995).

3.3 Marqueur hormonal pS2

Les ER, avec le ligand approprié, peuvent agir soit positivement ou négativement dans la régulation de l'expression de différents gènes. Un gène dont son expression est spécifiquement contrôlé par les estrogènes est le gène *pS2*, un gène marqueur de liaison des estrogènes aux ER (Masiakowski et al., 1982). L'augmentation de l'ARNm du *pS2* après l'addition de l'estradiol est un événement transcriptionnel primaire, suggérant que le contrôle de l'activité du promoteur du gène *pS2* par le ER est médié par l'élément de réponse estrogénique (ERE) (Berry et al., 1989). De plus, il a été démontré que l'expression du *pS2* chez le cancer du sein est fortement relié à la présence du récepteur des estrogènes (i.e. 98% des tumeurs produisant l'ARNm *pS2* expriment le récepteur des estrogènes) (Rio et al., 1987). Le produit du gène *pS2* est un peptide de 58 acides aminés et dont la fonction est présentement inconnue.

4. Métabolisme des estrogènes

Autrefois, il était considéré que le métabolisme oxydatif des estrogènes était un processus d'inactivation des estrogènes afin de les rendre plus facilement excrétables; aujourd'hui, il est maintenant apparent que cette situation est de loin plus complexe.

4.1 Oxydations métaboliques

Les enzymes des cytochromes P450 jouent un rôle critique dans la formation des estrogènes et dans leur métabolisme oxydatif subséquent. La biosynthèse des hormones estrogéniques à partir des androgènes est médiée par l'action d'un enzyme spécifique des cytochromes P450 nommé aromatase (Martucci et Fishman, 1993). Voir Figure 6.

Les estrogènes sont des hormones sécrétées par deux tissus: 60% des estrogènes sont formés par les ovaires, alors que 40% proviennent des surrénales qui sécrètent des androgènes transformés en estrogènes dans les tissus périphériques par cette même aromatase.

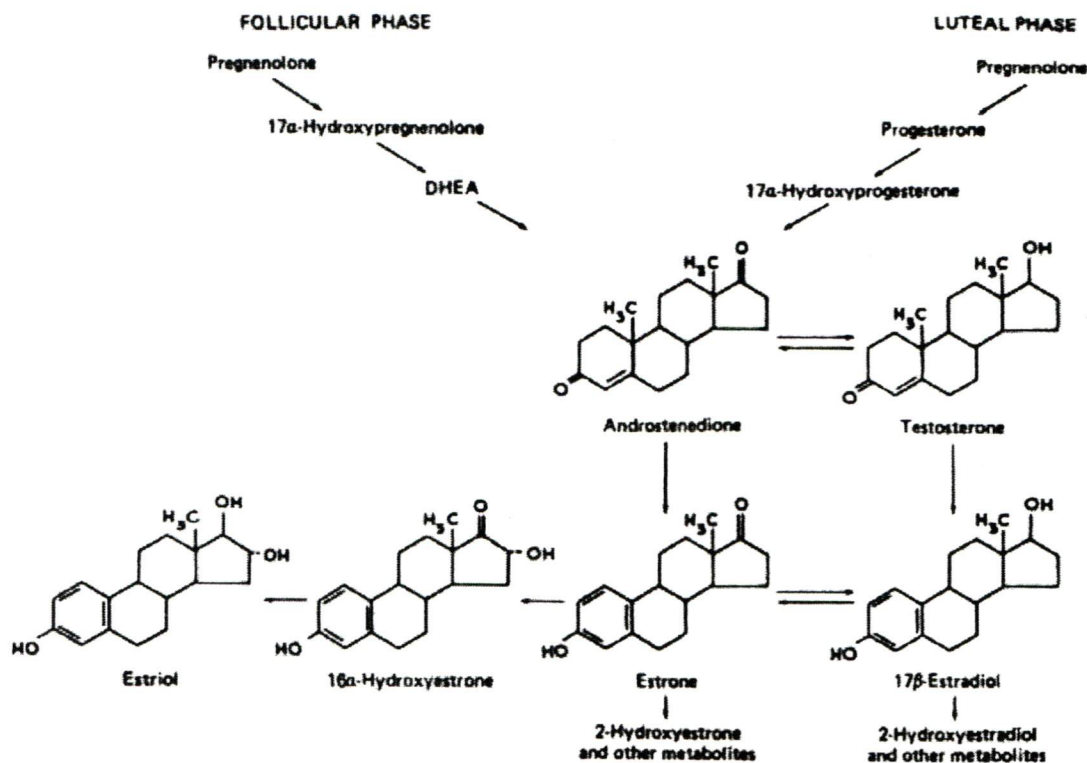
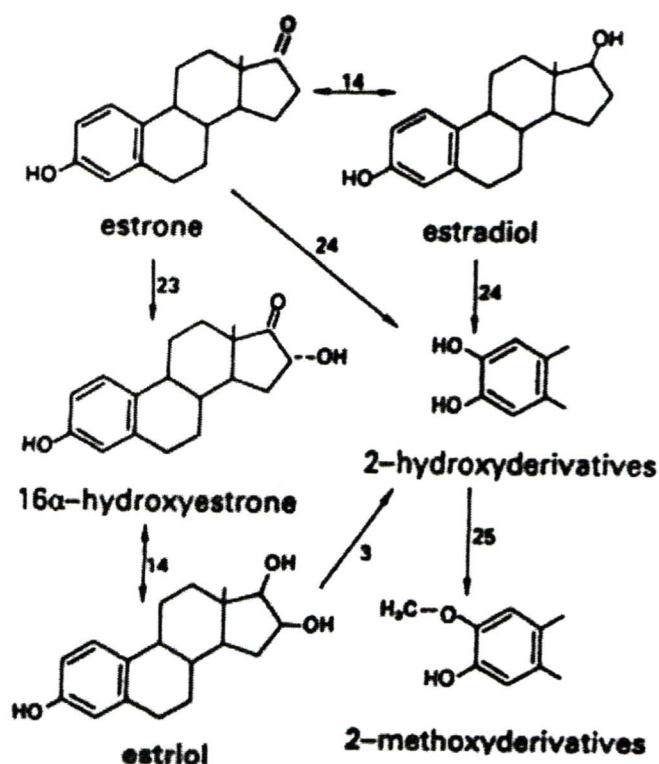


Figure 6. Biosynthèse des stéroïdes

Greenspan F.S., Baxter J.D. (1994) Basic and Clinical Endocrinology

4.2 Métabolites de l'estradiol

Une fois formés, les estrogènes entreprennent un métabolisme extensif, largement oxydatif, via l'action d'enzymes variés des cytochromes P450. La transformation de l'estradiol en ses métabolites peut aussi favoriser le développement de certains cancers. Après la formation de l'estradiol, des enzymes (2-, 4-, et 16 α -hydroxylase) modifient la position d'un de ses groupes hydroxyle-OH formant soit le 2-hydroxyestrone, le 4-hydroxyestrone ou le 16 α -hydroxyestrone (Lee Davis et Bradlow, 1995; Yager et Liehr, 1990).



Les abréviations des enzymes sont :

14= 17 β -hydroxystéroïde oxidoréductase

23= 16 α -hydroxylase

24= 2-hydroxylase

25= O-méthyl-transférase

Figure 7. Métabolites de l'estradiol

Bradlow L.H. et al. (1995) Environ. Health Perspect. 103: 147-150

4.2.1 16 α -hydroxyestrone

Le 16 α -hydroxyestrone est un estrogène réactif unique, il est présent chez les humains à des niveaux comparables à l'estradiol (Martucci et Fishman, 1993). Cet estrogène a l'habileté de former des liens covalents stables avec des composés comportant un groupement aminé. Ceci a été démontré avec la lysine (Bucala et al., 1986), l'albumine (Bucala et Cerami, 1983), les protéines membranaires de

l'érythrocyte (Bucala et al., 1984), les histones (Yu et Fishman, 1985) et avec les ER de cellules cancéreuses du sein (Swaneck et Fishman, 1991).

La formation d'un lien covalent entre le 16 α -hydroxyestrone et les protéines est un mécanisme en deux étapes, il a été suggéré qu'elle procède via la formation d'une base de Schiff avec des protéines suivit par un réarrangement de Heyns de l' α -hydroxyimine tel que démontré à la figure 9 (Miyairi et al., 1991).

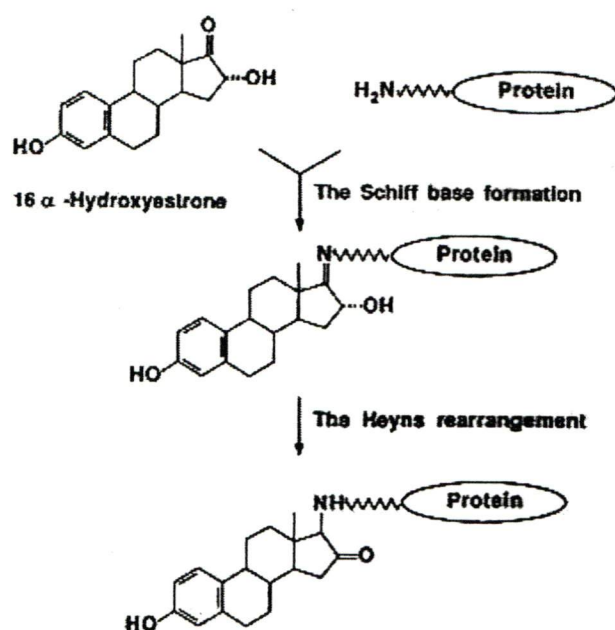


Figure 8. Adduit 16 α -hydroxyestrone
 Miyairi S. et al (1991) Steroids 56: 361-366

Chez l'humain, une étude portant sur des femmes ayant un cancer du sein a révélé que le tissu mammaire de ces femmes contenait près de cinq fois plus de l'enzyme 16 α -hydroxylase que le tissu des femmes saines (Fishman et al., 1984). Basé sur ces observations, il a été suggéré qu'un niveau élevé de 16 α -hydroxyestrone augmente le risque d'un cancer du sein par l'augmentation d'une prolifération

cellulaire incontrôlée, augmentant ainsi la probabilité d'accumuler des mutations (Yager et Liehr, 1990).

Dans des cultures à court terme, le 16 α -hydroxyestrone se lie efficacement au récepteur des estrogènes et démontre un degré d'activité presque aussi important que l'estradiol, lorsque mesuré par la stimulation de la prolifération cellulaire et lorsque l'expression des récepteurs des estrogènes et de la progestérone est élevée. Toutefois, avec une incubation à court terme, le 16 α -hydroxyestrone forme des associations covalentes avec les récepteurs des estrogènes, lesquelles produisent une diminution marquée de son activité estrogénique.

4.2.2 Catécholestrogènes

Les principaux estrogènes, l'estradiol et l'estrone, peuvent être métabolisés selon une autre voie que la 16 α -hydroxylation, soit des réactions d'hydroxylation en positions C2 et C4 sur l'anneau A menant à la formation des catécholestrogènes (CE) (Spicer et Hammond, 1989).

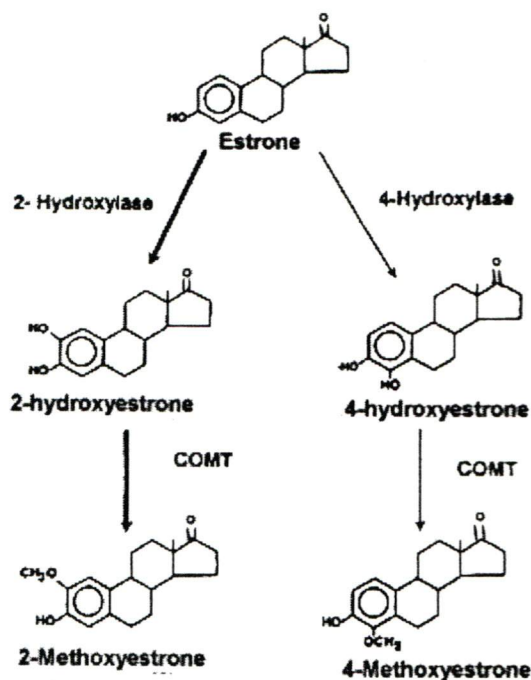


Figure 9. Formation des catécholestrogènes
 Spicer L.J., Hammond J.M. (1989) J. Steroid Biochem. 33: 489-501

Dans certains modèles, les estrogènes peuvent agir comme carcinogènes complets, i.e. comme initiateurs et promoteurs. Le meilleur de ces modèles est le développement d'une tumeur rénale chez le hamster traité chroniquement avec l'estradiol ou l'estrone (Kirkman, 1959).

Afin d'expliquer l'induction de tumeurs par les estrogènes dans ces modèles, une hypothèse a été développée impliquant la conversion des estrogènes en métabolites catéchols 2- et 4-hydroxyestrone (Liehr et Roy, 1990). Ces métabolites, en vertu de leurs structures hydroquinones, peuvent être impliqués dans un cycle rédox générant des espèces réactives de l'oxygène potentiellement mutagéniques (Liehr et al., 1986).

4.3 Cycle rédox des estrogènes

Les catécholestrogènes peuvent être métabolisés par un cycle rédox entre les formes hydroquinones (catéchols) et quinones via la formation intermédiaire de radicaux semiquinones. L'oxydation des hydroquinones est catalysée par le cytochrome P450 1A1/1A2. La réduction des quinones estrogéniques peut être catalysée par la NADPH-dépendante cytochrome P450 réductase, la NADH-dépendante cytochrome b5 réductase, la xanthine-xanthine oxydase, et d'autres enzymes (Yager et Liehr, 1990).

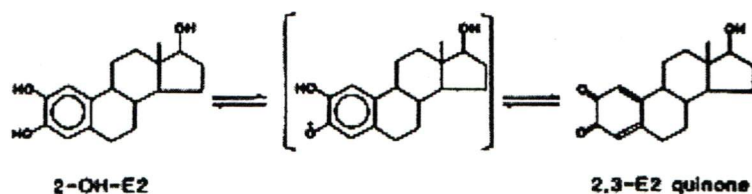


Figure 10. Cycle rédox des estrogènes
 Liehr J.G. et al (1986) J. Biol. Chem. 261: 16865-16870

Le cycle rédox de ces métabolites catécholestrogènes peut causer des dommages aux macromolécules cellulaires – incluant l'ADN, les lipides, et les protéines – par plusieurs mécanismes (Yager et Liehr, 1990).

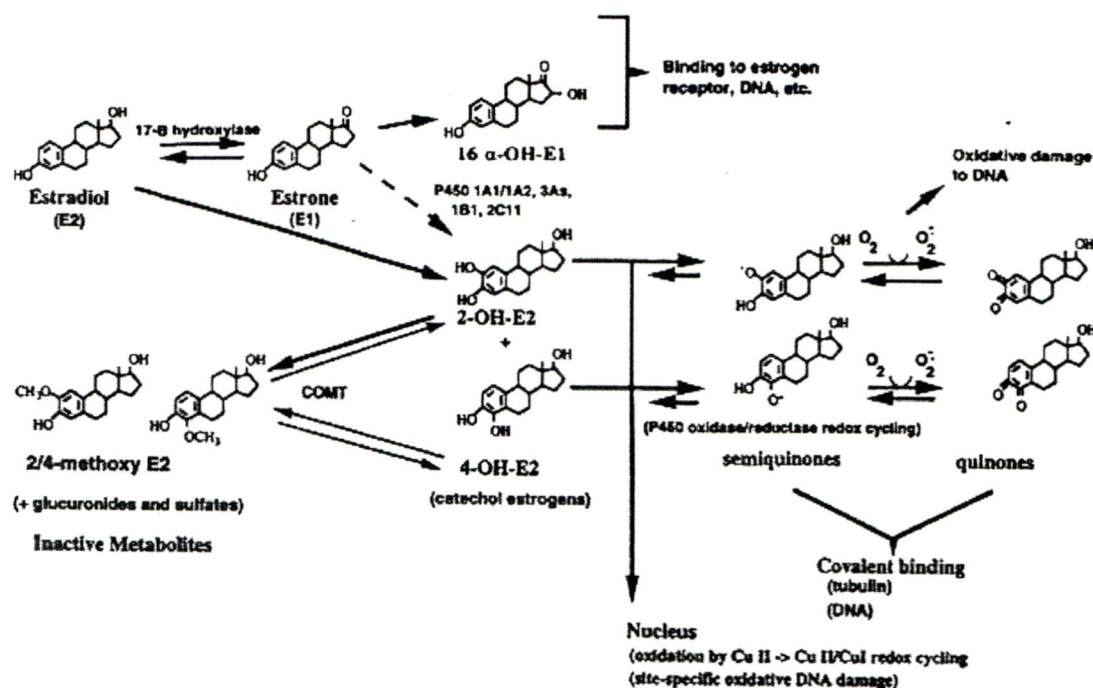


Figure 11. Métabolisme, cycle rédox et dommages par les estrogènes
Yager J.D., Liehr J.G. (1990) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36: 203-232

Les intermédiaires semiquinones du cycle rédox peuvent réagir avec l'oxygène moléculaire pour former des radicaux superoxydes. Cette réaction a été démontrée pour la quinone DES et la quinone 3,4-E₁(3,4-estrone) (Nutter et al., 1994). Les anions superoxydes sont éventuellement dismutés et forment le H₂O₂. Le peroxyde d'hydrogène, lui, subit ensuite la réaction de Fenton en présence d'ions métaux.

N.B. La réaction de Fenton ainsi que les diverses espèces réactives de l'oxygène seront discutés dans la prochaine section.

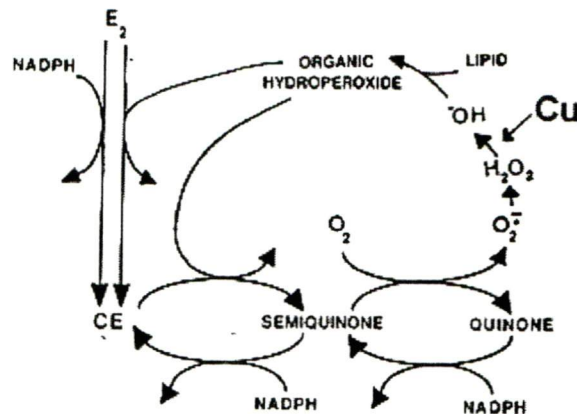


Figure 12. Cycle rédox des estrogènes et réaction de Fenton (Cu)
 Liehr J.G., Roy D. (1990) Free Radical Biol. Med. 8: 415-423
 E₂: estradiol, CE: catécholestrogènes

5. Stress oxydatif et cancer

Vue l'importance du dommage à l'ADN en carcinogénèse, il est concevable que tout agent capable de réagir avec l'ADN et modifier sa structure chimique peut être carcinogénique.

L'exposition d'organismes aux radiations ionisantes est depuis longtemps connu comme une cause du développement du cancer. Il a été démontré que la carcinogénèse induite par les radiations ionisantes implique l'initiation et la promotion. Une partie du dommage à l'ADN par les radiations survient par l'absorption directe d'énergie par cette molécule, mais la majorité est médiée par l'ionisation de l'eau et la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Une des espèces réactives de l'oxygène est le radical hydroxyle. Le radical hydroxyle peut attaquer l'ADN et générer toute une série de bases puriques et pyrimidiques modifiées. Il devient alors

important d'étudier les espèces réactives à l'oxygène comme mutagènes sérieux (Halliwell et Gutteridge, 1989).

5.1 Espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène sont continuellement générés dans les cellules exposées à un environnement aérobique. Les systèmes de défense antioxydants ont co-évolué avec le métabolisme aérobique afin de contrer les dommages oxydatifs produits par les ERO. Malgré la défense antioxydante, les dommages formés par les ERO aux protéines et à l'ADN s'accumulent durant la vie. Il a été postulé que ces dommages mènent à des maladies liées à l'âge telles que l'athérosclérose, l'arthrite, des désordres neurodégénératifs et le cancer.

Le développement du cancer est maintenant communément reconnu comme un processus microévolutionnaire qui requiert l'action cumulative d'événements multiples. Ces événements surviennent dans une cellule clonale et incluent un modèle simplifié à trois étapes : i) l'induction de mutations à l'ADN dans une cellule somatique (initiation), ii) la stimulation de l'expansion tumorigénique d'une cellule clonale (promotion) et iii) la conversion maligne d'une tumeur en un cancer (progression). Les espèces réactives de l'oxygène peuvent stimuler le développement d'un cancer au niveau de ces trois étapes: l'initiation, la promotion et la progression (Dreher et Junod, 1996).

5.1.1 Le radical hydroxyle

Un des radicaux libres le plus puissant est le radical hydroxyle (OH^\bullet). L'exposition des organismes vivants aux radiations ionisantes cause la fission de liaisons O-H de l'eau pour donner H^\bullet et OH^\bullet . Le radical hydroxyle réagit avec presque toutes les molécules des cellules vivantes. Lorsque le radical hydroxyle est formé *in vivo*, il endommage tout ce qui est près de lui, puisque OH^\bullet ne peut pas migrer sur une distance significative dans la cellule. Les effets néfastes du radical hydroxyle OH^\bullet sont ses attaques sur les protéines, les hydrates de carbone, les lipides et l'ADN.

5.1.2 L'anion superoxyde

Le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) est le produit de l'addition d'un électron sur l'oxygène. Il est produit par les cellules phagocytaires (neutrophiles, monocytes, macrophages, éosinophiles) et il les aide à inactiver les virus et les bactéries. Plusieurs évidences s'accumulent démontrant que $\text{O}_2^{\bullet-}$ peut être produit *in vivo* par plusieurs types cellulaires autres que les macrophages, incluant les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales vasculaires (Burdon et Rice-Evans, 1989).

En addition à cette production métabolique délibérée de $\text{O}_2^{\bullet-}$, ce radical peut aussi être produit par les 'accidents de la chimie'. L'anion superoxyde et le H_2O_2 peuvent aussi être générés par des réactions d'autoxydation. Le $\text{O}_2^{\bullet-}$ peut alors oxyder

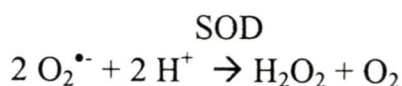
d'autres composés et initier une chaîne de réactions radicalaires. Cette autoxydation dépend fréquemment de la présence d'ions métaux.

Un autre site de formation de $O_2^{\bullet-}$ est la mitochondrie. La chaîne de transport d'électrons mitochondriale est un gradient de potentiel rédox, à partir du couple fortement réductant NADH/NAD⁺ à l' O_2 moléculaire (Halliwell, 1996).

Il doit être mentionné que les humains sont de gros mammifères consommant énormément d' O_2 . Par conséquent, seulement qu'avec la consommation d' O_2 de repos, le corps humain produit environ 2kg de $O_2^{\bullet-}$ par année (Halliwell, 1994).

5.1.3 Le peroxyde d'hydrogène

La plupart de l' $O_2^{\bullet-}$ généré *in vivo* subit une réaction de dismutation catalysée par la superoxyde dismutase (SOD), représentée par l'équation suivante :



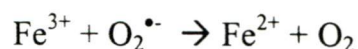
Ceci génère du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un non-radical. H_2O_2 ressemble à l'eau dans sa structure moléculaire et il diffuse facilement à travers les cellules et entre elles (Halliwell, 1996).

H_2O_2 peut réguler l'expression de certains gènes en menant le déplacement d'une sous-unité inhibitrice du facteur cytoplasmique de transcription génique NF- κ B. Le déplacement de cette sous-unité inhibitrice permet au facteur actif de migrer au noyau et d'activer différents gènes en se liant à des séquences spécifiques au niveau de

promoteurs. Ainsi H_2O_2 et d'autres peroxydes (tels que les lipoperoxydes) peuvent induire l'expression de gènes contrôlés par NF- κ B (Schreck et al., 1992).

5.2 La réaction de Fenton

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est formé dans plusieurs cellules aérobiques. La réaction des ions fers avec le H_2O_2 est une source probable de OH^\bullet *in vivo*, compte tenu que ces ions sont présents. Un commentaire semblable peut être fait pour les ions cuivre, qui peuvent eux aussi réagir avec H_2O_2 pour former OH^\bullet (Halliwell, 1989). Cette interaction entre le H_2O_2 et les ions métaux a été observée la première fois par Fenton en 1894. La première des deux réactions suivantes est la "superoxide-driven Fenton reaction" alors que la deuxième est la réaction de Fenton.



La résultante de ces deux réactions a été nommée la réaction de Haber-Weiss :



6. Mécanismes de défense contre les dommages oxydatifs

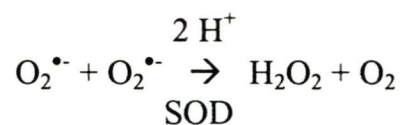
La réduction de l'oxygène moléculaire dans toutes les cellules eucaryotiques aérobiques résulte en la formation des intermédiaires $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , et OH^{\bullet} qui sont hautement toxiques. En réponse à ce stress, les organismes ont développé un système de défense (Troll et Wiesner, 1985).

On peut regrouper les systèmes de défense en trois groupes: les enzymes de détoxification (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathione peroxydase, la quinone réductase et la catéchol-O-méthyltransférase), les antioxydants non-enzymatiques endogènes (la bilirubine, le glutathion, et l'acide urique), et les antioxydants exogènes (l' α -tocophérol, le β -carotène, et l'acide ascorbique).

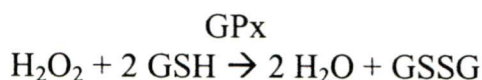
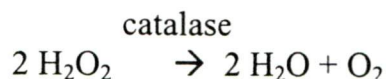
En vertu de ce présent projet de recherche, la révision du rôle du glutathion et des enzymes associés à celui-ci sera suffisante.

6.1 Superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase

L'enzyme superoxyde dismutase (SOD), identifié par Fridovich et McCord, détoxifie le radical superoxyde en le dismutant et en générant par la suite du H_2O_2 :



Le H_2O_2 formé par la dismutation de $\text{O}_2^{\bullet -}$ est détecté par deux enzymes, la catalase (lorsque la concentration de H_2O_2 est élevée) et la glutathion peroxydase (GPx):



Les estrogènes, comme mentionné précédemment, amènent la formation de ERO pouvant endommager plusieurs macromolécules cellulaires. Ceci a été démontré dans les modèles *in vivo* du rein et du foie du hamster Syrian, et *in vitro* chez des cellules cancéreuses humaines du sein.

6.2 Glutathion

Le tripeptide glutathion (GSH) est le composé non-protéique sulphydryle le plus abondant chez les cellules de mammifères. Sa concentration cellulaire varie entre 0.1 à 10 mmol/l. Ce composé, soit par lui-même ou faisant partie de réactions catalysées par la GSH peroxydase (tel que démontré dans la section précédente) et la GSH-S-transférase, jouent un rôle important dans la détoxification d'agents toxiques. Puisque ces enzymes se retrouvent dans le cytosol, la distribution du GSH est de même. Dans le système de la défense antioxydante, le GSH agit à de multiples niveaux: (1) comme un capteur de radicaux libres tels que $\text{O}_2^{\bullet -}$ et OH^{\bullet} , (2) comme substrat de l'enzyme antioxydant glutathion peroxydase (GPx) (Figure 14 Réaction 9),

(3) dans la réparation directe des lésions oxydatives à l'ADN, et (4) dans la conjugaison directe des composés toxiques eux-mêmes (Mans et al., 1992).

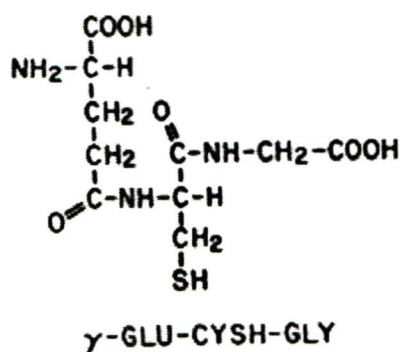


Figure 13. Structure du GSH
Arrick B.A., Nathan C.F. Can. Res. 44: 4224-4232

La biosynthèse du GSH comporte 2 étapes ATP-dépendantes successives. Premièrement, la γ -glutamylcystéine synthétase catalyse la formation d'un lien amide entre la cystéine et le groupement γ -carboxyl du glutamate (Figure 14 Réaction 1). La GSH synthétase médie ensuite la réaction de la glycine avec le groupement carboxyl de l'acide aminé cystéine du dipeptide γ -glutamylcystéine pour former le tripeptide γ -glutamylcystéinyglycine (Figure 14 Réaction 2).

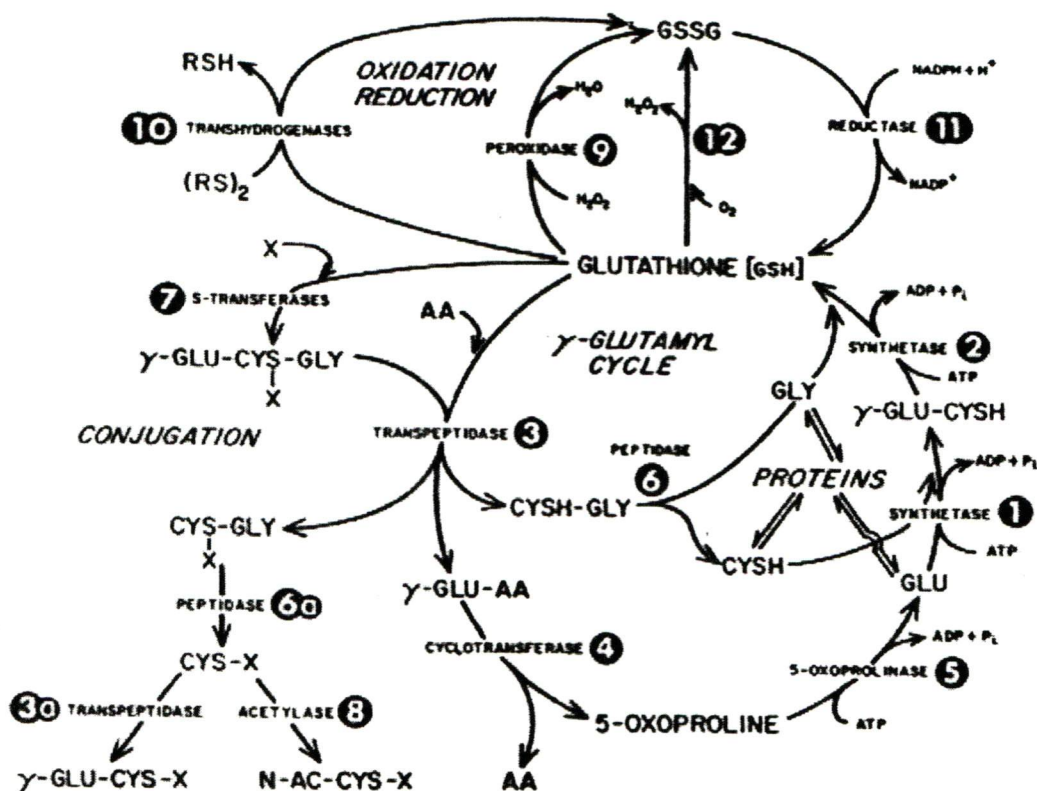


Figure 1 Overall summary of glutathione metabolism (see text): Reaction 1. γ -GLU-CYSH synthetase; Reaction 2. GSH synthetase; Reaction 3 and 3a. glutamyl transpeptidase; Reaction 4. γ -glutamyl cyclotransferase; Reaction 5. 5-oxoprolinase; Reactions 6 and 6a. dipeptidase; Reaction 7. GSH S-transferases; Reaction 8. N-acetylase; Reaction 9. GSH peroxidase; Reaction 10. transhydrogenase; Reaction 11. GSSG reductase; Reaction 12. oxidation of GSH by O_2 ; conversion of GSH to GSSG is also mediated by free radicals.

Figure 14. Métabolisme du GSH

Meister A., Anderson M.E. (1983) Annu. Rev. Biochem. 52: 711-760

L'élévation du contenu en GSH a été observée dans la protection des cellules en culture contre les dommages causés par les radiations et par une variété d'agents cytotoxiques. Le GSH a été en plus associé avec le développement de la résistance aux drogues *in vitro*. D'un autre côté, les cellules en culture qui sont démunies de GSH peuvent exhiber une augmentation de la sensibilité aux drogues cytotoxiques. Alors, l'efficacité des traitements anticancéreux peut dépendre du contenu tumoral en GSH (Mans et al., 1992).

7. L'agent chimiothérapeutique méthotrexate

Le méthotrexate (MTX) est un agent chimiothérapeutique qui a vu le jour en 1940 dans le traitement de la leucémie (Farber et al., 1948). Le MTX demeure, aujourd'hui, un antagoniste important de l'acide folique dans la chimiothérapie du cancer. Le MTX fait partie des programmes de traitements standards pour plusieurs néoplasmes, incluant le carcinome du chorion, la leucémie lymphoblastique aigüe, les lymphomes, les ostéosarcomes, le cancer du sein, et le cancer de la tête et du cou (Fleming et Schilsky, 1992).

7.1 Résistance au méthotrexate

7.1.1 Structure et mécanisme d'action du méthotrexate

Le MTX est un inhibiteur compétitif de l'acide folique au niveau de l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR), l'enzyme responsable de la réduction du 7,8-dihydrofolate (FH_2) en 5,6,7,8-tétrahydrofolate (FH_4). Leurs structures sont donc très similaires.

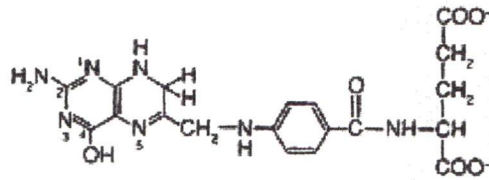
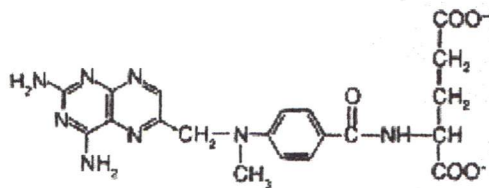
A**B**

Figure 15. Structures de l'acide folique et du méthotrexate
(A) 7,8-dihydrofolate (FH₂); (B) méthotrexate (MTX)
 Melera P.W. (1991) Can. Biol. 2: 245-255

Le MTX agit donc en épuisant les pools de folate réduit (FH₄), ce qui résulte en l'arrêt de la synthèse de l'ADN causée par la formation insuffisante de dTMP et de purines.

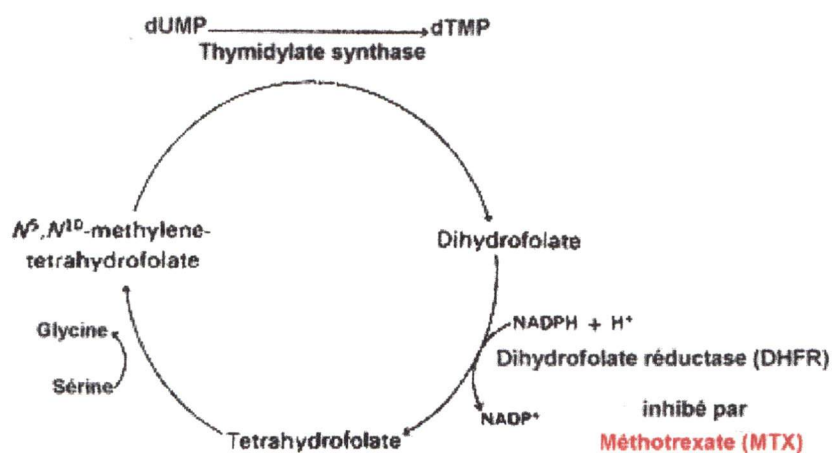


Figure 16. Mécanisme d'action du MTX
 Stryer L. (1988) Biochemistry. 3rd edition Freeman and co. New-York p.615

7.1.2 Mécanismes de résistance au méthotrexate

Plusieurs mécanismes de résistance au MTX ont été identifiés en culture cellulaire, incluant: 1) une accumulation diminuée du MTX due à un transport transmembranaire altéré, 2) un DHFR altéré (ou muté) qui lierait le MTX moins avidement que l'enzyme normal, 3) une augmentation des niveaux de DHFR, par amplification génique, 4) une rétention diminuée du MTX en conséquence d'un manque de polyglutamation, 5) une augmentation du niveau de l'enzyme lysosomal, γ -glutamyl hydrolase, qui hydrolyse les polyglutamates du MTX (Bertino et al., 1996).

7.2 Amplification génique

Un des moyens utilisés par certaines cellules pour répondre à une demande accrue en un produit donné est d'augmenter le nombre de copies du gène codant pour ce produit. Ce phénomène est appelé amplification génique. Dans la grande majorité des exemples connus, la taille de la région chromosomique amplifiée est bien plus importante que la seule unité transcriptionnelle dont l'amplification est requise. Deux grandes catégories de gènes sont amplifiés dans les cellules cancéreuses: les gènes de résistance aux drogues chimiothérapeutiques, d'une part (presque toujours *in vitro*); les proto-oncogènes, d'autre part (Szepetowski P. et al., 1991).

L'amplification génique dans une cellule peut être un moyen d'adaptation à de nouvelles conditions environnementales: on détecte ainsi des duplications de gènes dans des bactéries poussant en milieu sélectif. De même, l'amplification de régions

d'ADN contenant un gène permettant de résister à un agent de sélection est observée *in vitro* dans divers systèmes eucaryotes: résistance au méthotrexate (MTX) par amplification du gène codant pour la dihydrofolate réductase (DHFR), résistance au N-(phosphonoacétyl)-L-aspartate (PALA) par amplification du gène codant pour la protéine trifonctionnelle CAD (carbamylphosphate synthétase/aspartate transcarbamylase/dihydroorotase), en sont deux exemples.

De nombreux proto-oncogènes ont été associés à divers cancers humains. Leur activation en oncogènes est due soit à des altérations structurales de leur séquence codante (insertion, réarrangement, délétion, mutation ponctuelle), soit à des erreurs quantitatives ou qualitatives de leur expression (Szepetowski P. et al., 1991).

L'amplification d'ADN peut parfois être visualisée en cytogénétique, sous deux formes différentes. La première, extrachromosomique, correspond aux chromosomes minutes. Structures circulaires super-enroulées, souvent appelées double-minutes (DM) du fait de leur aspect dupliqué, ces éléments se répliquent de manière autonome et, ne possédant pas de centromère, sont distribués inégalement lors de la mitose. En absence de pression sélective, ils sont rapidement perdus dans la population cellulaire. L'autre forme visible est constitué par les HSR (Homogeneously Staining Region) ou ECR (Expanded Chromosome Region), régions intrachromosomiques étendues d'ADN amplifié, dont la ségrégation se fait normalement à chaque mitose, et qui sont donc conservées de manière relativement stable, même si la sélection n'est plus appliquée.

Un des événements initiateurs de l'amplification pourrait être la formation de séquences d'ADN extrachromosomiques, structures nommées épisomes (Wahl G.M.,

1989). Ces épisomes seraient créés par un événement de recombinaison intrachromosomique au sein d'une boucle de réplication, créant une délétion dans le chromosome et une molécule circulaire extrachromosomique. Si cette boucle de réplication contient une origine de réplication et un gène donnant à la cellule un avantage sélectif, elle pourrait conduire à la ségrégation inégale lors de la mitose et à l'amplification du ou des gènes en question (Figure 17). Des épisomes ont effectivement été identifiés dans plusieurs systèmes cellulaires, et des études récentes amènent à faire un lien entre délétion et amplification (Carroll S.M. et al., 1988; Hunt J.D. et al., 1990).

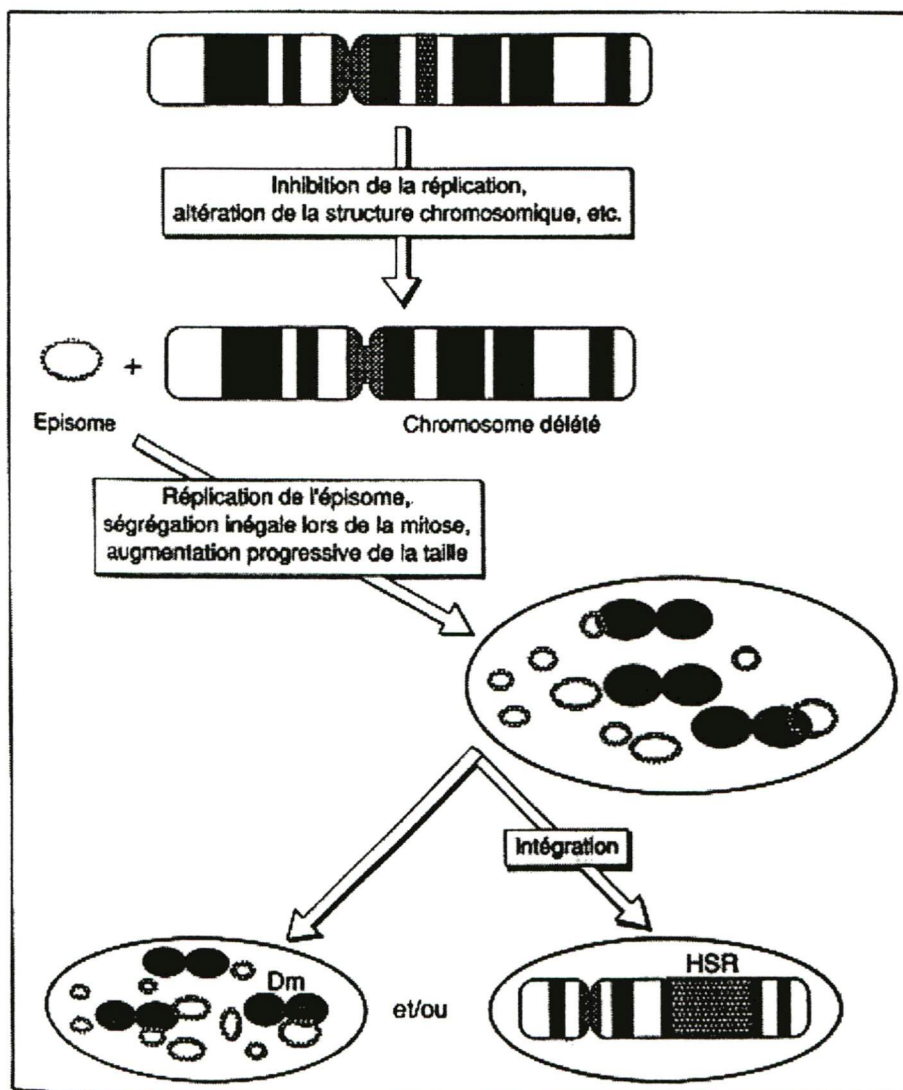


Figure 17. Schéma possible des étapes conduisant à la formation des chromosomes minutes (DM) et des régions chromosomiques étendues (HSR).
Szepletowski P. et al. (1991) Médecine/Sciences 7: 14-21

7.2.1 Amplification génique du *dhfr*

L'amplification génique du *dhfr* peut se présenter sous la forme d'un chromosome allongé, nommé HSR (homogeneously staining region), ou d'éléments extrachromosomique auto-répliquant nommés doubles-minutes (DMs). Il n'est pas clair pourquoi certaines lignées cellulaires génèrent des gènes *dhfr* amplifiés sur des DMs, alors que d'autres génèrent des gènes *dhfr* dans une configuration HSR. En

général, les lignées cellulaires qui maintiennent un karyotype stable tendent à avoir des HSRs, alors que des lignées cellulaires qui sont fortement instables tendent à avoir des DMs (Schimke R.T., 1984).

Il est bien documenté que certains agents peuvent stimuler cette résistance au MTX via une amplification du *dhfr* dans différents modèles cellulaires *in vitro*. Quelques uns de ces agents sont: les rayonnements UV, les rayons-X, et l'hydroxyurée (Brown P.C. et al., 1983; Tlsty T.D. et al., 1984; Hahn P. et al., 1990).

En clinique la résistance au MTX due à l'amplification génique du *dhfr* est un phénomène très peu documenté; toutefois, quelques études ont décelé cette amplification comme mécanisme de résistance au MTX chez des patients atteints de leucémie (Carman M.D. et al., 1984; Horns R.C. et al., 1984).

7.2.2 Le gène *dhfr*

L'équipe de Nienhuis ont réussi à coder le gène *dhfr* humain en 1984. Ce gène d'une longueur approximative de 30 kb possède 6 exons. Son expression donne un ARNm de 2 kilobases (Chen M.J. et al., 1984). Il est situé sur le chromosome 5, plus précisément entre q11.2 et q13.2 (Maurer B.J. et al., 1984).

Chez les trois mammifères les plus étudiés (homme, souris, lignée de hamster), la position et la longueur des exons demeurent essentiellement les mêmes ainsi que la position des introns, alors que la longueur des introns varie énormément (Figure 18).

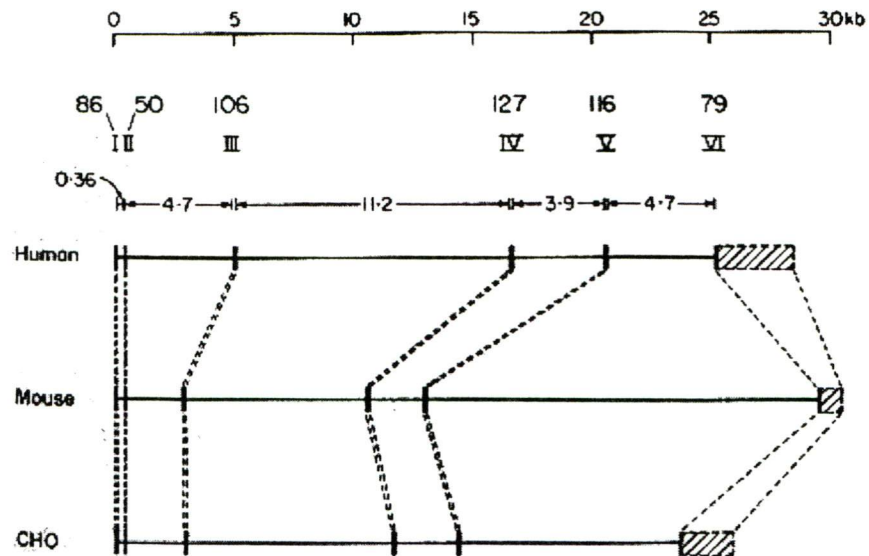


Figure 18. Le gène *dhfr*
 Yang J.K. et al. (1984) J. Mol. Biol. 176: 169-187
 CHO: Chinese hamster ovary

8. Gène suppresseur de tumeurs *p53*

Le cancer résulte de mutations qui amènent le dérèglement d'événements qui contrôlent la croissance et le développement normal cellulaire. Ces mutations surviennent dans deux classes de gènes: ceux qui facilitent la croissance cellulaire et la formation de tumeurs, dans lesquels une mutation ou une surexpression est oncogénique, et ceux qui inhibent ces processus (les gènes suppresseurs de tumeurs) dont la perte est oncogénique (Sager R., 1989).

Un *p53* normal agit comme un 'policier moléculaire', monitorant l'intégrité du génome. Si l'ADN est endommagé, le *p53* s'accumule et bloque la réplication cellulaire permettant ainsi la réparation de cet ADN endommagé. Si la réparation échoue, *p53* peut déclencher le suicide cellulaire par apoptose. Les cellules tumorales

dont le p53 est perdu ou inactivé par mutation, ne peuvent amener cet arrêt. Elles sont alors génétiquement moins stables et peuvent accumuler des mutations et des réarrangements génomiques à un taux plus élevé, menant à une sélection rapide de clones malins (Lane D.P., 1992). La perte de la réponse apoptotique n'est non seulement importante en tumorigénèse, mais semble aussi une source majeure de résistance à la thérapie antinéoplasique (Leonard C.J. et al., 1995).

8.1 Structure du gène *p53*

L'événement génétique le plus fréquemment rencontré en carcinogénèse humaine est l'altération du gène *p53* et de sa protéine. Le *p53* est situé sur le bras court du chromosome humain 17 (17p13). Sa longueur est d'environ 20 kb et sa partie codante consiste en 11 exons. Son expression donne un ARNm de 2.8 kilobases qui code pour une phosphoprotéine nucléaire de 53 kilodalton (d'où p53), laquelle contient 393 acides aminés (Donehower L.A. et Bradley A., 1993).

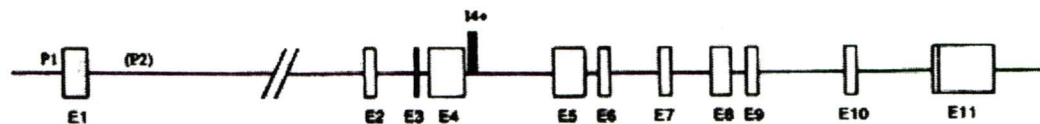


Figure 19. Les 11 exons du gène *p53*
Donehower L.A. et Bradley A. (1993) Biochem. Biophys. Acta 1155: 181-205

8.2 Structure de la protéine p53

La protéine p53 peut être divisée en trois sections: le domaine N-terminal acide (acides aminés 1-43), le domaine de liaison à l'ADN (acides aminés 100-300) et le domaine de tétramérisation basique C-terminal (acides aminés 300-393).

Le domaine N-terminal du p53 interagit avec plusieurs facteurs de transcription généraux tels que la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP) composante du facteur de transcription TFIID, plusieurs facteurs associés aux TBP (TAFs), et le facteur de transcription/réparation TFIIH, ainsi que l'association au produit mdm-2 que nous verrons plus tard.

La région centrale de p53 contient les séquences spécifiques de liaison à l'ADN. La majorité des mutations au p53 retrouvées chez les tumeurs sont situées dans cette région centrale. Ces mutations affectent les propriétés du p53 dont l'altération mène à une augmentation du potentiel tumorigénique chez ces cellules.

Le bout C-terminal peut être subdivisé en trois régions: un 'linker' qui connecte le domaine de liaison à l'ADN au domaine de tétramérisation, le domaine de tétramérisation lui-même, et à l'extrémité, une série de 30 acides aminés basiques (Ko L.J. et Prives C., 1996)

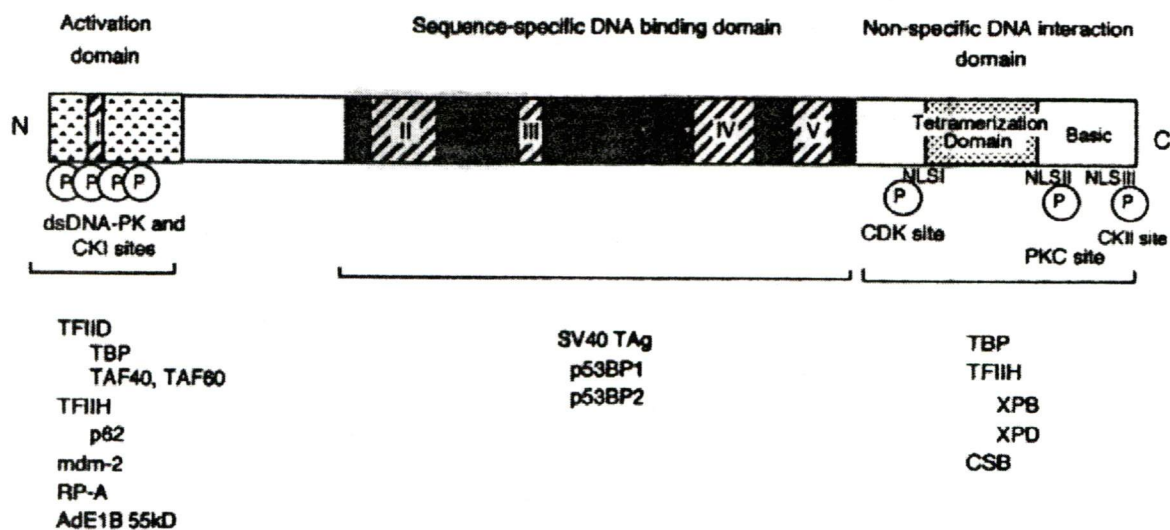


Figure 20. Structure et domaines de la protéine p53
Ko L.J., Prives C. (1996) Genes Dev. 10: 1054-1072

8.3 Rôle de p53

8.3.1 Réparation de l'ADN

Comme mentionné précédemment, le p53 interagit avec plusieurs facteurs de transcription généraux. Le fait d'inhiber la machinerie transcriptionnelle, permet à la cellule de réparer le dommage à son ADN (Ko L.J. et Prives C., 1996). A la suite d'un dommage à l'ADN, le p53 agit comme transactivateur de gènes tels que *GADD45* et *p21*. Il a été rapporté que la protéine *GADD45* agit avec le facteur de transcription et de réparation PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) afin d'inhiber l'entrée des

cellules en phase S. Il a aussi été démontré que le p21 se lie au PCNA ce qui l'empêche d'activer l'ADN polymérase δ (Smith M.L. et al., 1994). Comme mentionné plus loin, p21 mène à un arrêt du cycle cellulaire principalement par l'inhibition des CDKs (Cyclin-Dependent Kinases).

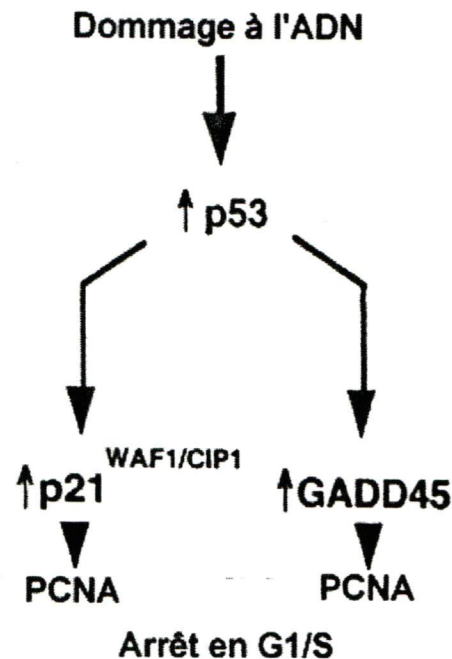


Figure 21. Dommage à l'ADN et p53
Leonard C.J. et al. (1995) *Imp. Adv. Oncol.* 32:33-40

8.3.2 p53 et mdm-2

Un complexe protéique p53-p90 a été identifié dans plusieurs lignées cellulaires. Lorsque la protéine p90 a été purifiée de ce complexe, elle a été identifiée comme le produit de l'oncogène *mdm-2* (murine double minute-2). Le p53 induit le *mdm-2* à la suite d'un dommage à l'ADN. Le gène *mdm-2* code pour une protéine qui

se complexe avec le p53, inhibant ainsi l'habileté du p53 d'activer la transcription. Alors ceci implique une boucle de feedback autorégulatoire entre le p53 et le mdm-2 (Momand J. et al., 1992).



Figure 22. Boucle entre p53 et mdm-2
Leonard C.J. et al. (1995) *Imp. Adv. Oncol.* 32: 33-40

8.3.3 Cycle cellulaire et p21

Lorsqu'il y a un dommage à l'ADN, le p53 stimule la synthèse du p21 qui induit un arrêt du cycle cellulaire en G1. Ces effets semblent principalement dus à l'action inhibitrice du p21 sur le complexe cdk2-cycline E, mais le p21 pourrait aussi être un régulateur universel des cdk-cyclines. Il semble que la formation et l'activation de ces complexes cdk-cyclines à des moments précis et ordonnés permettent la progression le long du cycle cellulaire et, notamment, le passage des différents points de contrôle. (Figure 23) (Darbon J.M. et al., 1995).

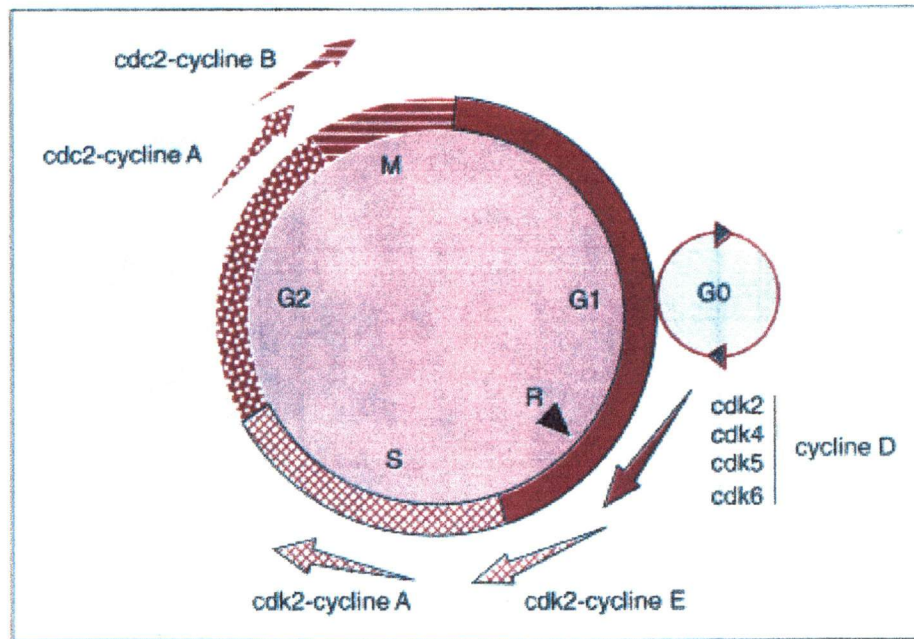


Figure 23. Contrôle du cycle cellulaire par les complexes cdk-cyclines
 Darbon J.M. et al. (1995) Médecine/Sciences 11: 349-356

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Modèle cellulaire et conditions de culture

1.1 Modèle cellulaire

Le modèle cellulaire utilisé lors de ces études était la lignée cancéreuse humaine du sein MCF-7. Ce type cellulaire a été isolé d'une femme de 69 ans de race blanche atteinte d'un cancer du sein en 1972 (Soule et al., 1973). Les cellules humaines MCF-7 expriment environ 485 fmol/mg de protéines du récepteur des estrogènes (Borras et al., 1994). La lignée cellulaire MCF-7 a été obtenue d'American Type Culture Collection (cat. #HTB-22) et a été cultivée dans du milieu de culture MEM (Minimal Essential Medium) (Sigma Chemicals, St-Louis, MO, cat.#A-6770) enrichi de 10% de FBS dialysé (Fœtal Bovine Serum) (Intergen, cat.#1020-90, lot #MB98212), pyruvate de sodium (1 mM), insuline bovin (10 µg/ml), L-glutamine (2 mM), pénicilline (50 unités/ml), streptomycine (50 µg/ml), et amphotéricine β (0.25 µg/mL), tous obtenus de Sigma Chemicals.

1.2 Traitement au DCC

Afin d'éliminer les estrogènes endogènes, le FBS est traité au DCC (Dextran-Coated Charcoal). Le DCC consiste en 0.25% de charbon (Norit A), 0.025% de dextran (P.M. 80 700), et 0.01 M Tris pH8.0. Ce traitement est effectué en mélangeant toute la nuit 40 ml de DCC à 200 ml de FBS. Ce sérum est par la suite centrifugé deux fois à 3400 rpm pendant 15 minutes, préfiltré afin d'éliminer les traces de DCC et ensuite stérilisé par filtration (Costar, 0.22 μ m) (Ince et al., 1995). En utilisant de l'estradiol radioactif à une concentration de 10^{-8} M comme marqueur, cette méthode élimine 97% de l'hormone.

1.3 Dialyse

Dans le but de bien déterminer le niveau de résistance au méthotrexate (MTX), le sérum est dialysé afin d'éliminer l'acide folique et le pool de dTMP qui sont impliqués dans la voie du métabolisme des nucléotides sur laquelle le méthotrexate effectue son effet toxique. En plus d'éliminer ces analogues au méthotrexate, la dialyse élimine aussi des facteurs nécessaires à la croissance des cellules. Donc le nombre changements de NaCl contre lequel le sérum est dialysé ainsi que la durée de la dialyse ont été déterminés après plusieurs essais. Les conditions de dialyse optimales du FBS que nous avons déterminées étaient de 3 heures contre 10 fois son volume dans une concentration de 0.8% NaCl final.

2. Détermination du LD₅₀

Le LD₅₀ (LD₅₀: concentration létale de MTX qui tue 50% des cellules) est déterminé par essai de formation de colonies en ensemençant en triplicata 1000 cellules MCF-7 dans des Pétris p100 qui sont incubées 8 heures plus tard avec du méthotrexate (MTX) (Sigma Chemicals, St-Louis, MO) à une concentration s'étalant de 1 à 20 nM. Le milieu contenant du MTX est renouvelé à tous les trois jours, au douzième jour, les colonies sont colorées et comptées. Les résultats provenant de deux expériences séparées ont donné un LD₅₀ de 7.5 nM pour les MCF-7.

3. Détermination du taux de mutation induisant une résistance au méthotrexate par essai Luria-Delbrück

3.1 Essai Luria-Delbrück

L'essai Luria-Delbrück est une combinaison de méthodes expérimentales et statistiques qui permettent de distinguer entre les cellules résistantes à un agent quelconque qui émergent suite à une rare mutation spontanée ou d'une mutation induite (Luria et Delbrück, 1943). Le taux de cellules MTX-résistantes a été déterminé par l'essai Luria-Delbrück (Tlsty et al., 1989). L'analyse est basée sur la variation entre le nombre de colonies qui émergent de cultures parallèles comme décrit à la figure 24. Cette figure illustre un diagramme schématisant l'expérience Luria-Delbrück et les résultats hypothétiques qui peuvent être obtenus.

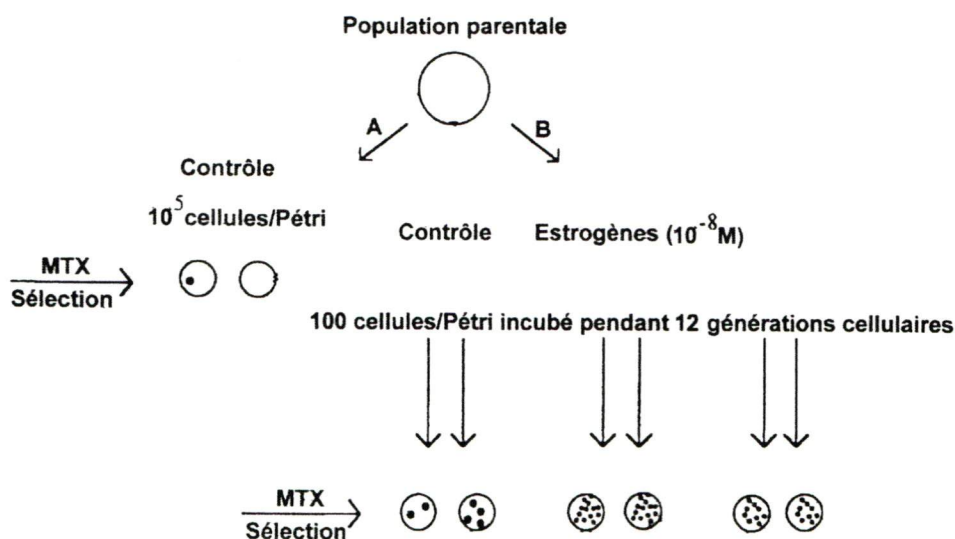


Figure 24. Diagramme illustrant l'analyse Luria-Delbrück

La première série de boîtes de Pétri (Fig. 24A) contient des échantillons répétitifs dans lesquels 10⁵ cellules d'une population mère sontensemencées directement dans le milieu de sélection (9 X LD₅₀) puis analysées selon le nombre de colonies résistantes qui ont émergées. Les colonies émergeant de ces boîtes de Pétri représentent de rares cellules MTX-résistantes qui pourraient exister dans la population cellulaire initiale. Parmi ces Pétris, la variation dans le nombre de colonies/Pétri devrait exhiber une distribution Poisson, et la moyenne du nombre de colonies par Pétri devrait refléter la prévalence de mutants résistants chez la population parentale.

Pour la seconde série de boîtes de Pétri (Fig. 24B), 100 cellules (nombre assez petit pour éliminer la possibilité d'ensemencer des cellules déjà résistantes) sontensemencées dans 20 Pétris et prolifèrent pendant 12 générations cellulaires avec l'un des estrogènes, soit l'estradiol, ou ses métabolites 2-, 4- ou 16 α -hydroxyestrone (Sigma Chemicals, St-Louis, MO) à une concentration de 10⁻⁸ M. Comme contrôle,

l'essai est effectué avec du milieu de culture contenant de l'éthanol 0.01%, le solvant utilisé pour solubiliser les estrogènes. Lorsque les populations individuelles ont atteint la même densité cellulaire que les boîtes de Pétri de la série A, 10^5 cellules sont transférées dans de nouvelles boîtes de Pétri et placées dans le milieu de sélection ($9 \times LD_{50}$). La résistance au MTX pourrait arriver lors des premières ou des dernières divisions cellulaires durant l'exposition aux estrogènes, et par conséquent le nombre de colonies qui émergeront du milieu de sélection variera beaucoup. Une analyse statistique de ces cellules résistantes permet de calculer le taux d'apparition des mutations spontanées et induites par l'estrogène. Ce taux est calculé selon la formule établie par Capizzi et Jameson (1973):

$$Cr = (C\mu N_t) \ln (C\mu N_t)$$

où μ représente le taux de mutation (MTX-résistance) par cellule par génération, C est le nombre de boîtes de Pétri dans une série, r est le nombre moyen de mutants par série et N_t le nombre total de cellules. Ces deux derniers paramètres ont été ajustés pour l'efficacité de clonage correspondant. En connaissant r , N_t , C et Cr , le taux de mutation μ est obtenu en consultant la table fournie par Capizzi et Jameson. Puisque la probabilité d'apparition d'une mutation dans une cellule individuelle est directement reliée à la vitesse de réplication cellulaire, ces expériences étaient effectuées sous des conditions de croissance cellulaire logarithmique, où la vitesse de réplication cellulaire est constante et reproductible. L'essai Luria-Delbrück a été effectuée deux fois.

3.2 Efficacité de clonage

L'efficacité de clonage de la souche sauvage des MCF-7 ainsi que les cellules MTX-résistantes, devrait être connue afin de connaître le nombre de cellules survivantes ensemencées dans les boîtes de Pétri. Cinq cents cellules MCF-7 de la population parentale et de clones MTX-résistants induits par l'un des estrogènes testés sont individuellement ensemencé dans trois Pétri p100. Le milieu de culture est remplacé une fois, les colonies sont colorées et comptées dix jours après l'ensemencement.

4. Préparation des fragments d'ADN pour les sondes radioactives

Insert	Longueur	Sites de restriction	Références
DHFR	735 bp	EcoRI	Bebbington et Hentschel (1987)
pS2	559 bp	Pst I	Masiakowski et al. (1982)
GAPDH	1000 bp	Pst I	Boudreau et al. (1996)

Le plasmide contenant le cDNA du pS2 provient d'ATCC (American Type Culture Collection, 57136), alors que le GAPDH et le DHFR proviennent du Dr Claude Asselin du département d'anatomie et de biologie cellulaire de l'Université de

Sherbrooke. Après la digestion enzymatique, les fragments d'ADN sont séparés sur gel d'agarose 0.8%. La bande d'agarose correspondant est découpée et le cDNA est purifié avec la trousse d'isolement QIAEX (QIAGEN, CA). Les enzymes de restriction (Pharmacia, Biotech Inc., Qc) ont été utilisés selon les recommandations du manufacturier. Une quantité de 25 ng de l'insert était ensuite marqué par 'Random labelling' avec du dCTP-P³².

5. Détermination de l'amplification du gène *dhfr*

Les cellules MCF-7 parentales ainsi que les cellules MTX-résistantes sontensemencées à une densité de 3×10^5 cellules par Pétri de 150 mm² (p150). Chaque point représente trois p150. Lorsque les cellules sont à 70% de confluence, l'ADN est extrait par la méthode de 'Salting out' (Cooper T.G., 1977), tel que décrit dans la section suivante.

5.1 Extraction de l'ADN

Les cellules de trois p150, représentant un échantillon, sont lavées au PBS (phosphate-buffered saline), grattées à l'aide d'un policeman et placées dans un tube conique de 15 ml. Les tubes sont ensuite centrifugés à 2500 rpm à la température de la pièce. Les culots obtenus sont ensuite resuspendus dans 9 ml de tampon de lyse (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 2 mM Na₂EDTA pH 8.2) et 0.3 ml de SDS 20% (sodium dodécyl sulfate). Afin de digérer les protéines, 90 µl de Protéinase K (20

mg/ml) (Boehringer Mannheim, Laval, Qc) est ajouté et les tubes sont par la suite incubés pendant 3 heures à 55°C. Les protéines sont ensuite précipitées par l'ajout de 2.7 ml de NaCl 5 M et les tubes sont agités vigoureusement pendant 1 minute. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 3500 rpm pendant 15 minutes à la température de la pièce. Cette opération peut être répétée si on n'obtient pas un culot dense de protéines. Pour faire précipiter l'ADN, le surnageant est transféré dans un nouveau tube et 2.5 volumes d'éthanol 95% sont ajoutés. L'ADN est retiré à l'aide d'une pipette Pasteur et il est resuspendu dans 0.4 ml de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). Les tubes Eppendorf contenant l'ADN sont incubés à 55°C pendant 1 heure. A la suite de cette incubation, 8 µl de ribonucléase A (100 µg/ml) (Sigma Chemicals, St-Louis, MO) est ajouté et les tubes sont incubés à 37°C pendant 1 heure. L'ADN est précipité une deuxième fois en ajoutant 2.5 volumes d'éthanol 95% et il est ensuite retiré et incubé à 55°C pendant 1 heure comme précédemment. La quantité d'ADN obtenue de chacun des échantillons est mesurée par densité optique à 260 nm prise à l'aide d'un spectrophotomètre (Varian 2200, Palo Alto, CA).

5.2 Transfert Southern

Les échantillons d'ADN (10 µg) sont digérés avec l'enzyme de restriction EcoRI et séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8 % à 40 volts pendant 4 heures. Les ADNs sont transférés sur une membrane de nylon Hybond-N+ (Amersham, Oakville, Ont.) dans une solution 0.4 N NaOH à l'aide d'un système de transfert sous vide (Tyler Research Instruments) pendant toute la nuit. La membrane

est ensuite neutralisée dans du 2X SSC (0.3 M chlorure de sodium, 0.03 M citrate trisodique). Cette méthode est effectuée selon Southern (1975).

5.3 Hybridation

La membrane de nylon est incubée dans la solution de préhybridation (5X Denhardt's, 6X SSC, 1% SDS, 250 µg/ml ssDNA) dans un tube, à 67°C avec agitation pendant 36 heures. Elle est par la suite incubée dans la solution d'hybridation (5X Denhardt's, 6X SSC, 1% SDS, 250 µg/ml ssDNA) contenant 1×10^6 cpm/ml de DHFR ou de GAPDH marqué au P^{32} dans un volume de 7.5 ml pendant 18 à 20 heures à 67°C. Deux lavages à 65°C sont ensuite effectués dans une solution de 2X SSC/0.1% SDS pendant 15 minutes, une fois dans une solution de 1X SSC/0.1% SDS pendant 30 minutes, une fois dans une solution de 0.2X SSC/0.1% SDS pendant 45 minutes, et brièvement dans une solution de 0.2X SSC. La membrane est finalement exposée dans une cassette à autoradiographie (FBXC 810, Fisher Scientific, PA) avec écrans intensificateurs sur un film BioMax (Kodak, NY) à -80°C. Les films sont scannés avec un scanner UMAX Power Look II et l'intensité relative des bandes de DHFR et GAPDH est déterminée avec le programme 1.58f NIH Image. Les valeurs de DHFR sont ensuite normalisées par rapport au contrôle GAPDH.

6. Activation de la transcription du gène *pS2* par les estrogènes

Les cellules MCF-7 parentales ainsi que les cellules MCF-7 MTX-résistantes sont incubées pendant 5 jours avec les estrogènes (10^{-8} M). Chaque point représente deux p100 contenant chacun 2×10^5 cellules. Au bout de ces cinq jours, l'ARN total est extrait par la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987), tel que décrit dans la section suivante.

6.1 Extraction de l'ARN total

Les cellules sont resuspendues dans 3 ml de solution dénaturante (6.25 M de guanidium thiocyanate, 0.04 M de citrate de sodium pH 7.0, 0.8% N-lauroylsarcosine et 0.1 M β -mercaptoéthanol). On ajoute ensuite 0.3 ml d'acétate de sodium 2 M pH 4.0, 3 ml de phénol acide saturé avec de l'eau pH 6.4 et 0.8 ml de chloroforme:alcool iso-amyl 49:1. L'homogénat est mélangé par la suite vigoureusement pendant 10 secondes et est placé sur glace. Les échantillons sont centrifugés à 10 000 g pendant 20 minutes à 4 °C. Après la centrifugation, l'ARN est présent dans la phase aqueuse alors que l'ADN et les protéines sont présents à l'interphase ainsi que dans la phase phénolique. La phase aqueuse est transférée dans un tube frais, mélangée avec 3 ml d'isopropanol et ensuite placée à -20 °C pendant 1 heure et demie afin de précipiter l'ARN. Une autre sédimentation à 10 000 g pendant 20 minutes est effectuée résultant en un culot d'ARN qui est ensuite dissout avec 0.5 ml de la solution dénaturante, transféré dans un tube Eppendorf de 1.5 ml, et précipité

avec un volume d'isopropanol à -20°C pendant 1 heure et demie. Après la centrifugation dans une microcentrifugeuse pendant 10 minutes à 4°C , le culot d'ARN est resuspendu avec 75% d'éthanol, sédimenté, séché à l'air pendant 15 minutes, et ensuite dissout avec 15 μl d'eau. La quantité d'ARN total obtenue de chacun des échantillons est mesurée par densité optique à 260 nm prise à l'aide d'un spectrophotomètre (Varian 2200, Palo Alto, CA).

6.2 Transfert Northern

Les échantillons d'ARN totaux (15 μg) sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant du tampon MOPS (200 mM acide sulfonique 3-[N-Morpholino] propane sodium, 7 mM EDTA, 50 mM acétate de sodium) et 1% formaldéhyde à 80 volts pendant 1 heure et 15 minutes. Les ARNs sont transférés sur une membrane de nylon Hybond-N⁺ (Amersham) dans une solution 0.04 N NaOH à l'aide d'un système de transfert sous vide (Tyler Research Instruments) pendant 2 heures et demie. La membrane est ensuite neutralisée dans 2X SSC (0.3 M chlorure de sodium, 0.03 M citrate trisodique).

6.3 Hybridation

La membrane de nylon est incubée dans la solution de préhybridation (120 mM Tris pH 7.4, 600 mM NaCl, 8 mM EDTA, 0.1% pyrophosphate de sodium, 0.2% SDS et 625 $\mu\text{g/ml}$ héparine) dans un tube, à 65°C avec agitation pendant 4 à 6 heures.

Elle est par la suite incubée dans la solution d'hybridation (solution de préhybridation avec 10% de dextran sulfate) contenant 1×10^6 cpm/ml de pS2 ou de GAPDH marqué au P^{32} dans un volume de 7.5 ml pendant 20 heures. Elle est ensuite lavée dans une solution de 2X SSC à la température de la pièce pendant 20 minutes, et à 65°C avec agitation dans une solution de 0.1X SSC pendant 60 minutes et 0.1% SDS pendant 30 minutes. La membrane est finalement exposée dans une cassette à autoradiographie (FBXC 810, Fisher Scientific, PA) avec un écran intensificateur sur un film XAR-5 (Kodak, NY) à -80°C. Les films sont scannés avec un scanner UMAX Power Look II et l'intensité relative des bandes de pS2 et GAPDH est déterminée avec le programme 1.58f NIH Image. Les valeurs de pS2 sont ensuite normalisées par rapport au contrôle GAPDH.

7. Détermination de la concentration de glutathion (GSH)

Les cellules MCF-7 parentales ainsi que les cellules MCF-7 MTX-résistantes sont incubées pendant 5 jours avec les estrogènes (10^{-8} M). Chaque point représente trois p100 contenant chacun 1×10^5 cellules. Au bout de ces cinq jours, le GSH est extrait par la méthode de Tietze, tel que décrit dans la section suivante. Afin de lyser les cellules, les culots cellulaires sont resuspendus avec 100 µl de 1% Triton X-100 et sont placés à la température de la pièce pendant 5 à 10 minutes.

7.1 Mesure du glutathion

A partir de chacun des échantillons, 50 μ l est prélevé et mélangé avec 50 μ l de DTNB (Acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque, Sigma Chemicals, St-Louis, MO). Le tout est ensuite placé à la noirceur. Au moment de la lecture, 50 μ l de ce mélange est déposé dans une cuvette de 1.5 ml contenant déjà 925 μ l de tampon B (100 mM $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 100 mM K_2HPO_4 , 100 mM $KHPO_4$, 5 mM Na_2EDTA). Afin d'engendrer la réaction nécessaire pour mesurer le GSH, 150 mM de NADPH et 2 unités de GR (Glutathione Réductase) sont ajoutés et mélangés par inversion 3 fois juste avant la lecture sur le spectrophotomètre à 412 nm (Beckman DU-7, Mississauga, Ont.) qui s'effectue dans le laboratoire du Dr André Cantin du service de pneumologie de l'Université de Sherbrooke. La courbe standard est effectuée de la même façon que les échantillons sauf que le produit utilisé est du GSSG (Sigma Chemicals, St-Louis, MO) qui est convertit en 2 GSH lors de la réaction avec le GR. Donc, il faut multiplier les valeurs obtenues avec les échantillons par 2 lors de l'analyse des résultats.

7.2 Dosage protéique

Afin de standardiser les valeurs de GSH obtenues pour les échantillons les uns par rapport aux autres, les résultats sont exprimés en nanomoles de GSH par milligrammes de protéines (nmoles/mg prot.). Les protéines sont dosées selon le

micro-essai protéique Bio-Rad (Bio-Rad, Mississauga, Ont.) à l'aide d'un spectrophotomètre à 595 nm (Varian 2200, Palo Alto, CA). La courbe standard est effectuée avec du BSA (Bovine Serum Albumin, 500 µg/ml, Sigma Chemicals, St-Louis, MO).

8. Détermination du statut du gène suppresseur de tumeur *p53*

Cette détermination du statut du gène suppresseur de tumeurs *p53* a été effectuée en collaboration avec Nathalie Bissonnette dans le laboratoire du Dr. Darel Hunting du Département de médecine nucléaire et de radiobiologie de l'Université de Sherbrooke.

Les cellules MCF-7 parentales ainsi que les cellules MTX-résistantes sont incubées pendant 24 heures avec les estrogènes (10^{-8} M). Chaque point représente un p100 contenant 3×10^5 cellules. Après 24 heures les cellules sont irradiées et les protéines sont extraites, tel que décrit dans la section suivante.

8.1 Irradiation et préparation de l'extrait cellulaire

Les cellules sont irradiées avec une source de ^{60}Co à un débit de dose de 15 cGy/sec (radiation gamma) ou aux UVB (302 nm) à un débit de dose de 20 Watts/sec. Les cellules sont lavées et récoltées dans une solution saline (0.8% NaCl). Les protéines cellulaires totales sont extraites à l'aide d'un tampon de lyse (25 mM Hepes

pH 7.8, 2 mM EDTA, 1% NP40, 15% glycerol, 1 mg/ml PMSF, 10 µg/ml d'un cocktail d'antiprotéases: leupeptin, chymostatin et pepstatin A, et 2 mM dithiothreitol).

8.2 Électrophorèse et transfert Western

Le SDS-PAGE est effectué sur des minigels utilisant le système de tampons décrit par Laemmli (1970). Un gel de concentration 5% d'acrylamide et un gel de séparation 12% d'acrylamide sont utilisés. Des montant égaux de protéines provenant de différents échantillons sont placés dans de l'eau bouillante pendant 4 minutes en présence du tampon de gel SDS (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 0.01% bleu de bromophénol, 10% 2-mercaptoéthanol et 15% glycérol) et migrés sur gel pendant 90 minutes à 160 volts. Après le transfert sur nitrocellulose, la membrane était premièrement bloquée avec 8% de lait en poudre dans du TBS (10 mM Tris-HCl pH 8.0 et 150 mM NaCl) pendant 1-2 heures et incubée avec l'anticorps primaire approprié pendant toute la nuit. La visualisation de l'anticorps secondaire est effectuée par la procédure de détection chimiluminescente (PIERCE, Rockford, IL) selon le protocole du manufacturier (Chromatographic Specialties Inc., Brockville, ON).

8.3 Anticorps

L'anticorps anti-p53, monoclonal DO-1, provient du Dr. Bohdan Wasylyk (I.G.B.M.C. Illkirch, France) et l'anticorps anti-p21 est obtenu chez Oncogene Science (Cambridge, MA).

III. RÉSULTATS

1. Amplification d'une résistance au méthotrexate par les estrogènes.

Dans le but de déterminer si les estrogènes peuvent amplifier une résistance au MTX, nous avons utilisé l'essai Luria-Delbrück (Luria et Delbrück, 1943) afin de mesurer le taux de mutation correspondant. L'analyse est basée sur la variation entre le nombre de colonies qui émergent de cultures parallèles comme décrit à la figure 25.

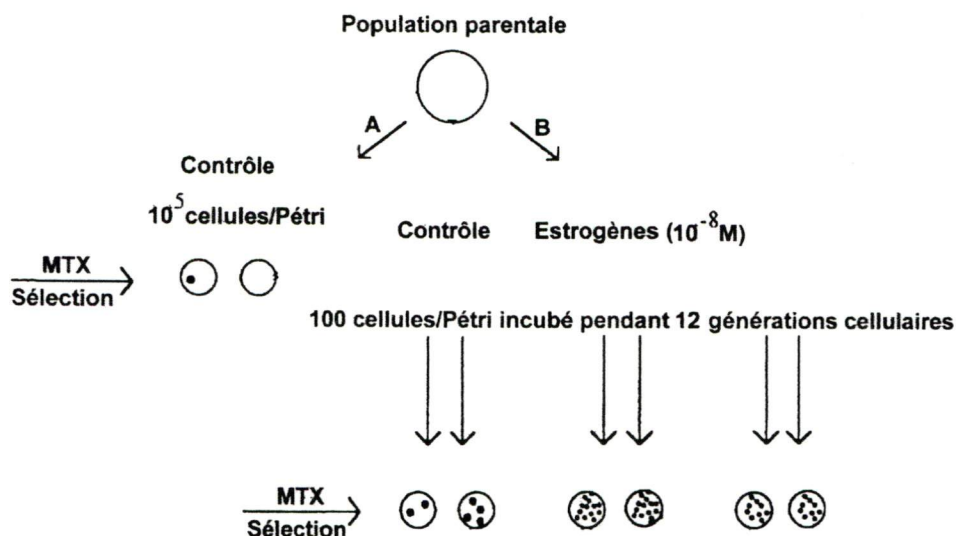


Figure 25. Diagramme illustrant l'analyse Luria-Delbrück

100 cellules cancéreuses du sein MCF-7 (nombre assez petit pour éliminer la possibilité d'ensemencer des cellules déjà résistantes) étaient ensemencées dans 40 boîtes de Pétri et proliféraient pendant 12 générations cellulaires avec l'un des estrogènes, soit l'estradiol ou ses métabolites 2-, 4- ou 16 α -hydroxyestrone à une concentration de 10⁻⁸ M. Comme contrôle, l'essai était effectué avec du milieu de

culture contenant de l'éthanol 0.01%, le solvant utilisé pour solubiliser les estrogènes. Après ces 12 divisions cellulaires, les hormones étaient enlevées et des populations individuelles (10^5 cellules) de chaque série de boîtes de Pétri parallèles étaient transférées dans de nouvelles boîtes de Pétri et placées dans le milieu de sélection contenant 9 fois le LD_{50} du MTX.

Les événements qui ont menés à la résistance étaient soit spontanés (contrôle sans estrogènes) ou induits par les estrogènes. Dans une série de boîtes de Pétri, chaque culture en croissance a la même probabilité de générer des mutants résistants à chaque division cellulaire. Dans certaines boîtes de Pétri, la résistance au MTX apparaissait tôt et ainsi plusieurs cellules filles résistantes étaient générées pour former un grand nombre de colonies résistantes au MTX. Dans d'autres boîtes de Pétri, l'événement apparaissait pendant l'une des dernières divisions cellulaires, générant ainsi peu de colonies résistantes au MTX. L'analyse statistique de cette variation permet de calculer le taux d'apparition des mutants spontanés ou induits par les estrogènes. Le taux de mutation est calculé selon la formule adaptée par Capizzi et Jameson (1973), décrit en détails dans la section Matériels et Méthodes.

La figure 26 illustre des grosses colonies MTX-résistantes typiques qui sont apparues dans le milieu de sélection après l'incubation avec le 2-hydroxyestrone.

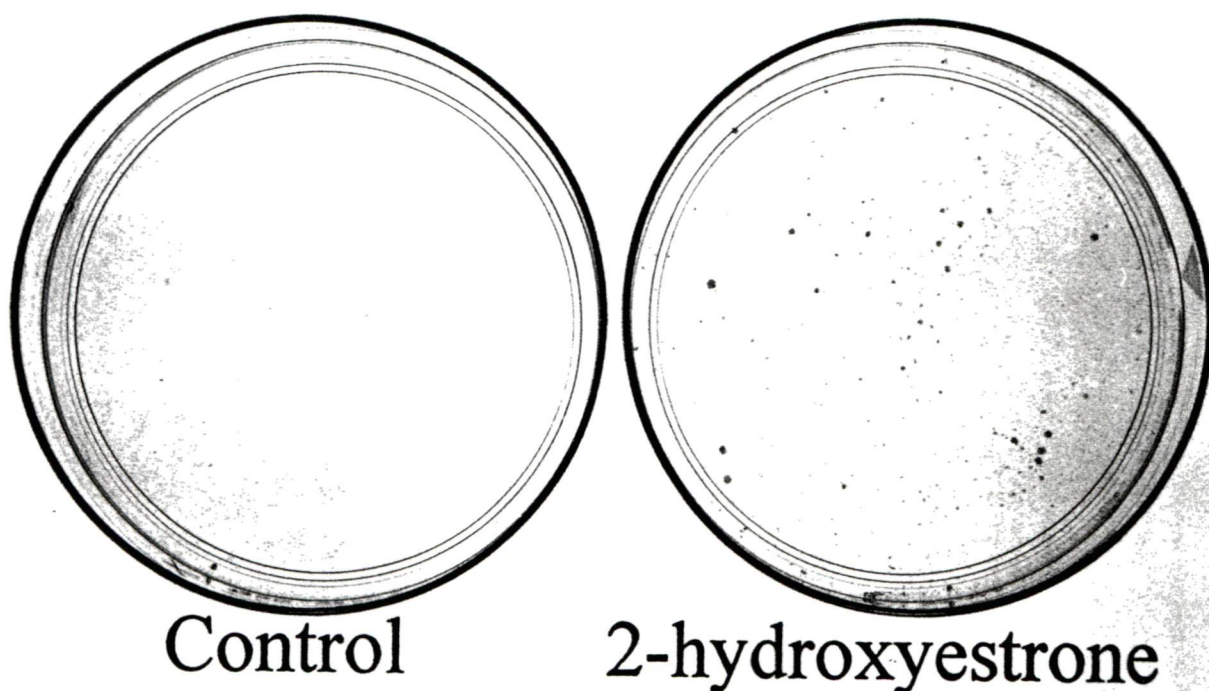


Figure 26. Illustration de colonies MTX-résistantes après exposition au 2-hydroxyestrone ou l'éthanol (0.01 %) effectué par essai Luria-Delbrück.

Dans le tableau 1, le taux de résistance au MTX par cellule par génération induit par l'estradiol ou les 2-, 4- et 16 α -hydroxyestrone sont rapportés. Les résultats démontrent clairement que les estrogènes étudiés ont amplifié le développement d'une résistance au MTX chez la lignée cellulaire cancéreuse du sein MCF-7. Les estrogènes les plus efficaces sont le 4-hydroxyestrone et le 16 α -hydroxyestrone qui ont stimulé l'apparition de cellules MCF-7 résistantes au MTX au même niveau, i.e. 88 fois par

rapport au contrôle. Le 2-hydroxyestrone démontre aussi un bon potentiel avec un facteur d'amplification de 33 fois, alors que l'estradiol démontre un faible effet avec un facteur d'amplification de seulement 3.2 fois. Ces résultats ne peuvent pas être reliés à une grande modification de la prolifération cellulaire survenant lors de l'exposition aux estrogènes. En fait, une différence de seulement 0.27 division cellulaire a été notée entre les différentes séries de boîtes de Pétri à la fin de l'incubation avec les hormones.

Tableau 1. Amplification par les estrogènes d'une résistance au MTX.

Traitement	Taux de résistance au MTX par cellule par génération ^a	Facteur d'amplification ^b	Valeur-p ^c
Contrôle (0.01% éthanol)	1.8×10^6		
Estradiol	6.38×10^6	3.2	0.07
2-hydroxyestrone	6.01×10^5	33	1.22×10^{-8}
4-hydroxyestrone	1.58×10^4	88	1.04×10^{-8}
16 α -hydroxyestrone	1.61×10^4	88	8.66×10^{-8}

^a Calculé selon l'essai Luria-Delbrück et l'équation modifiée par Capizzi et Jameson

^b Rapport entre le taux obtenu avec un estrogène/taux obtenu avec l'éthanol

^c Signification analysée par le t-test

^d L'éthanol était utilisé pour dissoudre les estrogènes, la concentration finale dans le milieu de culture était 0.01%.

Afin de démontrer que les cellules résistantes au MTX sont réellement apparues à la suite de l'incubation avec ces estrogènes et n'étaient pas seulement le résultat d'une sélection, le nombre de cellules MTX-résistantes pré-existantes dans la population parentale de cellules MCF-7 a été déterminé. Les cellules MCF-7 (1×10^5) de la population parentale étaient directement incubées dans le milieu de sélection (i.e.

9 X LD₅₀ du MTX) sans exposition aux estrogènes et les colonies MTX-résistantes étaient par la suite comptées. Après la sélection, une moyenne de seulement 1.8 colonies MTX-résistantes par 1 X 10⁵ cellules MCF-7ensemencées étaient mesurées.

Pendant la détermination de la résistance au MTX induit par les estrogènes, 100 cellules viables étaientensemencées par boîte de Pétri, ce qui correspond à un nombre de cellules MTX-résistantes pré-existantesensemencées de seulement 0.0018 par 100 cellules. Conséquemment, nous pouvons suggérer qu'aucune cellule MTX-résistante pré-existante était présente dans les 100 cellulesensemencées par boîte de Pétri au début de l'essai Luria-Delbrück.

L'absence de cellules MTX-résistantes pré-existantes était aussi démontré en analysant le nombre maximal de colonies MTX-résistantes à la fin de l'essai de mutation. En fait, si une des 100 cellulesensemencées au début de l'essai Luria-Delbrück était déjà résistante et croît avec la même capacité reproduction/survie que les autres cellules, le rapport des cellules filles MTX-résistantes pré-existantes sur les autres cellules ne changerait pas. Conséquemment, à la fin de l'incubation avec les estrogènes, 10³ des 10⁵ cellules (i.e. 1/100 = 10³/10⁵) transférées dans le milieu de sélection représenterait les cellules filles MTX-résistantes pré-existantes. Dans nos séries d'expériences, nous n'avons jamais obtenu 10³ cellules résistantes au MTX dans une boîte de Pétri. Le nombre maximal mesuré était plutôt de 203 cellules MTX-résistantes. Alors, ces données confirment qu'aucune cellule MTX-résistante pré-existante a étéensemencée au début de l'incubation avec les estrogènes, et les colonies résistantes qui ont émergé après la sélection (i.e. 9 X LD₅₀ de MTX) étaient réellement induites par les estrogènes.

2. Amplification génique du *dhfr* chez les clones MTX-résistants induits par les estrogènes.

Le gène *dhfr* code pour l'enzyme dihydrofolate réductase impliquée dans le métabolisme des nucléotides, et sur lequel le MTX effectue son effet toxique. Afin de vérifier si cette résistance au MTX était due à une amplification du gène *dhfr* induite par les estrogènes, nous avons mesuré le niveau de ce gène chez les cellules MCF-7 parentales ainsi que chez les cellules MTX-résistantes. L'autoradiogramme du GAPDH provenant d'une autre hybridation était utilisé comme contrôle interne.

Durant la sélection au MTX ($9 \times \text{LD}_{50}$), des colonies résistantes ont émergées. Deux colonies résistantes formées par chacun des traitements aux différents estrogènes ont été isolées. Malgré le fait que ces cellules proliféraient dans le milieu de sélection, l'expression de la résistance au MTX était progressivement perdue et tous les clones cessaient progressivement de croître dans le milieu de sélection dans les trois semaines suivantes leurs isolations.

Des clones résistants ont aussi été cultivés en parallèle en absence de MTX après l'essai Luria-Delbrück. L'analyse de l'ADN par Southern blot à ce moment démontrait aucune amplification du gène *dhfr* (Figure 27). D'autre part, puisqu'il n'y avait pas suffisamment d'ADN dans les colonies initiales obtenues après l'essai Luria-Delbrück, et que l'expression de la résistance au MTX était perdue pendant les divisions cellulaires subséquentes, nous ne pouvons pas présentement confirmer que cette réversibilité de la résistance au MTX est liée à la perte de l'amplification génique.

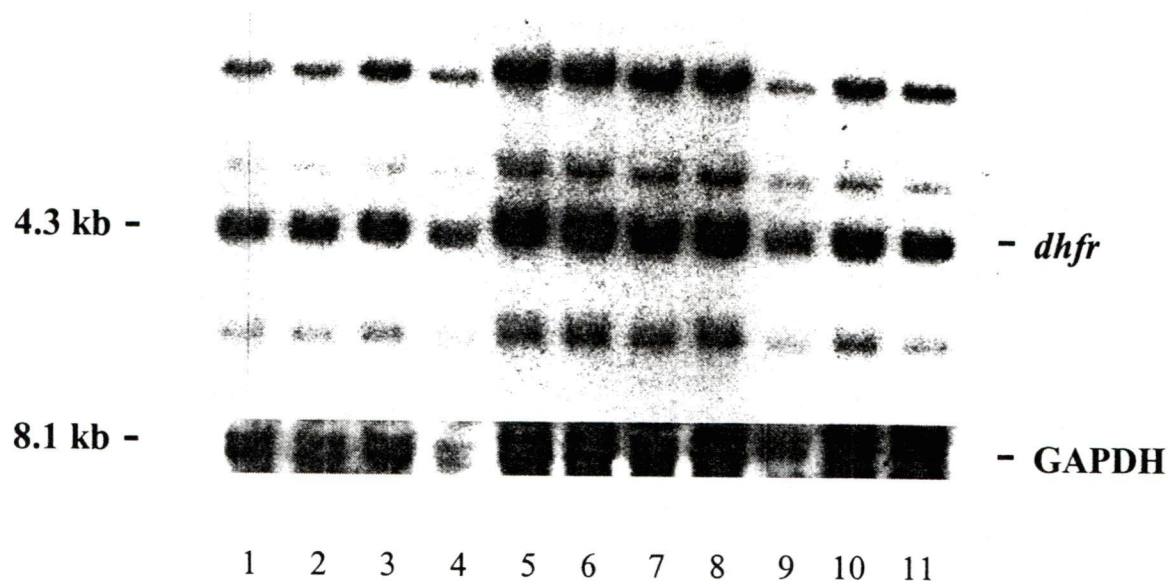


Figure 27. Amplification du gène *dhfr* par les estrogènes.

Les puits respectifs correspondent à: 1) MCF-7 parental; 2) clone MTX^R-EtOH-1; 3) clone MTX^R-E₂-1; 4) clone MTX^R-E₂-2; 5) clone MTX^R-2OHE₁-1; 6) clone MTX^R-4OHE₁-1; 7) clone MTX^R-4OHE₁-3; 8) clone MTX^R-16αOHE₁-1; 9) clone MTX^R-16αOHE₁-2; 10) clone MTX^R-EtOH-1; 11) MCF-7 parental
 E₂: estradiol; 2-OHE₁: 2-hydroxyestrone; 4-OHE₁: 4-hydroxyestrone; 16α-OHE₁: 16α-hydroxyestrone

3. Induction du *pS2*

Il est connu que l'expression du gène *pS2* est spécifiquement activé par le complexe estradiol-récepteur (Brown et al., 1984). Afin de déterminer si le développement de la résistance au MTX par l'estradiol et ses métabolites (2-, 4- et 16α-hydroxyestrone) implique la voie du récepteur des estrogènes, l'expression du *pS2* était utilisée comme marqueur de l'activité hormonale. Les colonies MTX-résistantes induites par les estrogènes ont été isolées et incubées pendant 5 jours avec leurs hormones respectives à une concentration de 10^{-8} M. L'ARN était extrait par la

méthode de Chomczynski et Sacchi (1987) et ensuite analysé par transfert Northern tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. L'ARNm du GAPDH était utilisé comme contrôle interne. Tel que démontré sur la figure 28, le niveau basal du *pS2* est très faible en absence d'estradiol, et il n'est pas significativement augmenté par l'éthanol.

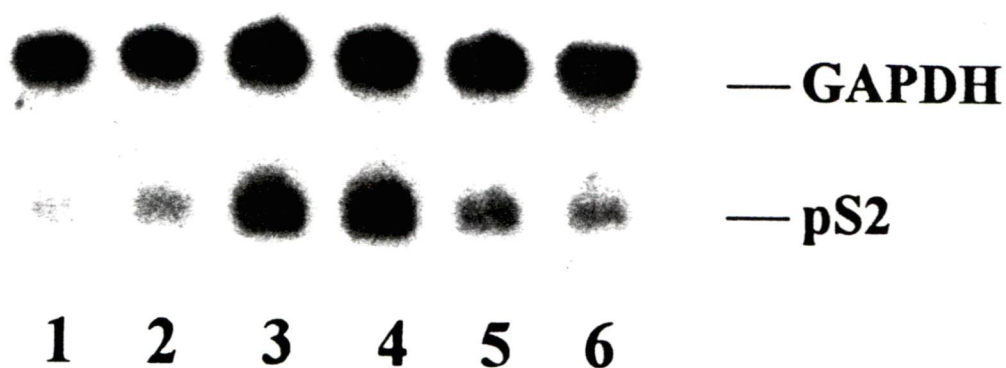


Figure 28. Stimulation du niveau d'ARNm du *pS2*

1) MCF-7 parental; 2) clone MTX^R-EtOH-1; 3) clone MTX^R-E₂-1; 4) clone MTX^R-16 α -OHE₁; 5) clone MTX^R-2-OHE₁; 6) clone MTX^R-4OHE₁

L'induction relative du *pS2* est schématisée à la figure 29. La réponse maximale était obtenue en présence d'estradiol et de 16 α -hydroxyestrone, alors que les métabolites catéchols (2-, et 4-hydroxyestrone) n'ont pas stimulé le gène *pS2*.

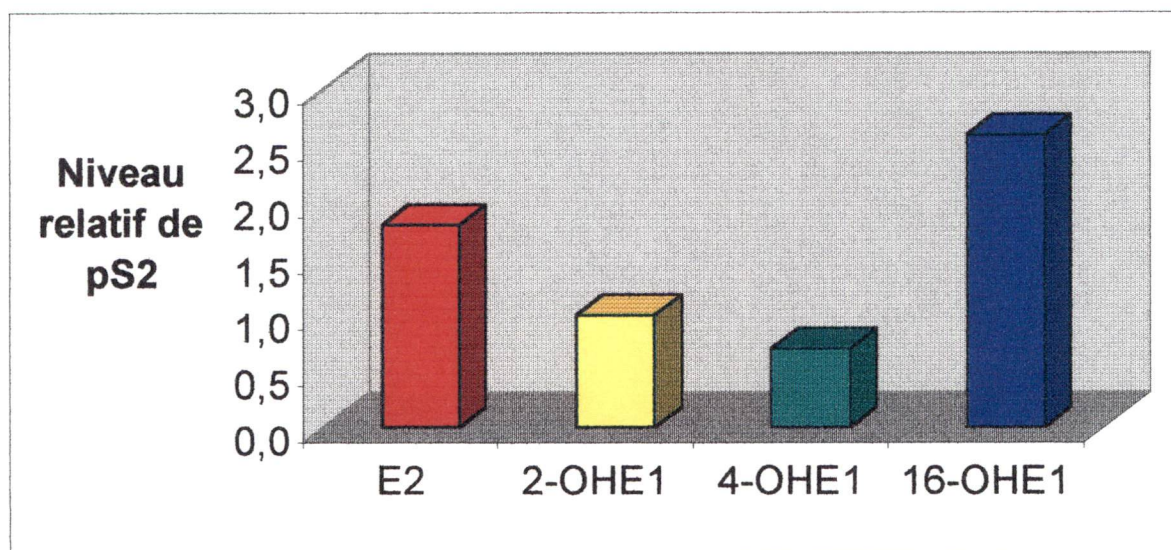


Figure 29. Niveau relatif du marqueur hormonal *pS2* induit par l'estradiol et ses métabolites.
 E₂: estradiol; 2-OHE₁: 2-hydroxyestrone; 4-OHE₁: 4-hydroxyestrone; 16 α -OHE₁: 16 α -hydroxyestrone

4. Implication des ERO dans la résistance au MTX.

Il a été démontré que des métabolites de l'estradiol, les catécholestrogènes (2-, et 4-hydroxyestrone), sont impliqués dans un cycle rédox générant des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Dans le but de vérifier si ces ERO pourraient jouer un rôle, le niveau de l'antioxydant glutathion (GSH) était mesuré après différents temps d'incubation chez le clone MTX-résistant-2OHE₁-1 avec les hormones (10⁻⁸ M) 2-hydroxyestrone (2-OHE₁) et son dérivé méthylé, 2-méthoxyestrone (2-MeOHE₁), qui est incapable de générer des ERO.

La figure 30 démontre que le 2-hydroxyestrone stimule le niveau du GSH chez le clone MTX^R-2OHE₁-1 selon une cinétique atteignant un maximum à 180 minutes et dont l'induction est de 2.07 fois plus forte que le 2-méthoxyestrone, ce dernier ne stimulant pas le niveau du GSH ($p < 0.004$). Le GSH servant de défense contre les ERO, ceci indique qu'ils sont formés par le 2-hydroxyestrone en assez grande quantité pour générer un stress oxydatif.

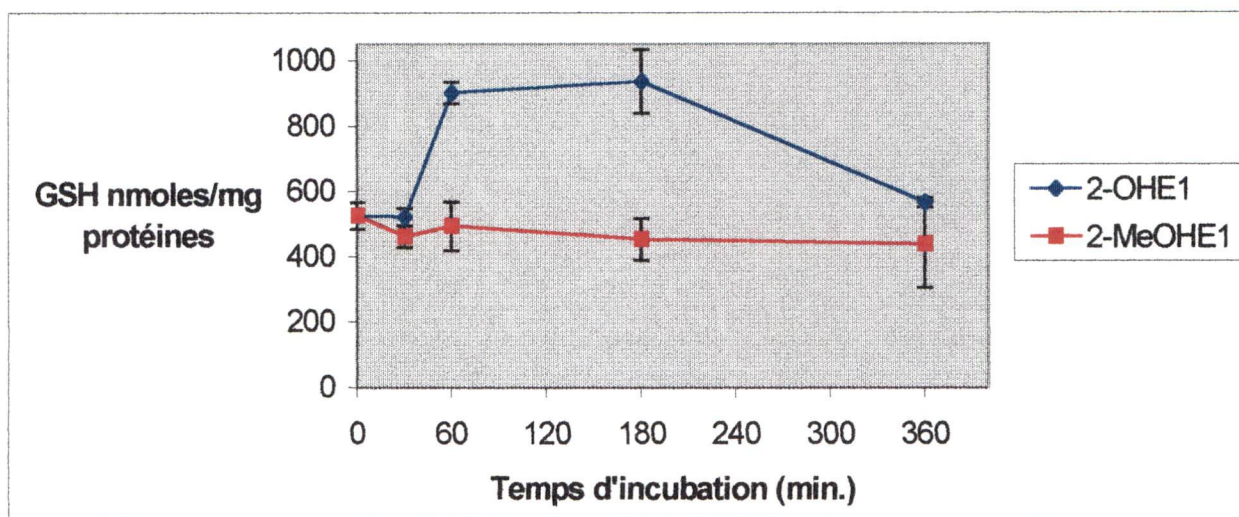


Figure 30. Stimulation du glutathion (GSH) chez le clone MTX^R-2OHE₁-1 en présence de 2-hydroxyestrone (2-OHE₁) ou de 2-méthoxyestrone (2-MeOHE₁).
n = 3; $p < 0.004$

Par la suite, afin de vérifier si les ERO formés par le 2-hydroxyestrone peuvent être impliqués dans la résistance au MTX, nous avons modifié l'essai Luria-Delbrück tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. Le GSH a été abaissé selon une méthode classique impliquant le buthionine sulfoximine (BSO). Le BSO inhibe la synthèse du GSH en agissant spécifiquement sur la γ -glutamyl-cystéine synthétase, l'étape limitante de la synthèse du glutathion. L'utilisation de ce produit nous permettait alors de vérifier si le 2-OHE₁ pouvait amplifier plus fortement la résistance au MTX en absence de GSH.

Dans la première série de boîtes de Pétri, nous avons abaissé le niveau de GSH en incubant les cellules MCF-7 avec le BSO à une concentration de 25 μ M pendant 48 heures. Ce traitement au BSO abaisse le GSH à 15.6%, sans induire de forte toxicité (survie 82%). A la suite de cette incubation, le BSO a été retiré et nous l'avons remplacer par du milieu de culture frais pour la période des 12 divisions cellulaires précédant la sélection au MTX. En parallèle dans une autre série de boîtes de Pétri, la baisse de GSH a été conjugué à l'addition du 2-OHE₁ en incubant les cellules MCF-7 avec le BSO pendant 24 heures pour ensuite le retirer et le remplacer par le 2-OHE₁ et le BSO pour un autre 24 heures. A la suite de cette incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu de culture frais contenant seulement le 2-OHE₁ pour la période des 12 divisions cellulaires précédant la sélection au MTX.

Le tableau 2 démontre que le 2-OHE₁ seul amplifie la résistance au MTX de 33 fois et le BSO seul de 109.6 fois par rapport au contrôle, alors que le 2-OHE₁ après traitement au BSO amène un facteur d'amplification de 427.8. Ce qui suggère que les métabolites catéchols 2-hydroxyestrone et possiblement le 4-hydroxyestrone semblent amplifier la résistance au MTX par la formation de ERO.

Tableau 2. Effet du buthionine sulfoximine sur la résistance au MTX amplifié par le 2-hydroxyestrone

Traitement	Taux de résistance au MTX par cellule par génération	Facteur d'amplification
Contrôle (éthanol)	1.8×10^{-6}	1.0
2-OHE ₁	60.1×10^{-6}	33.0
BSO (25 μ M)	197×10^{-6}	109.6
BSO + 2-OHE ₁	770×10^{-6}	427.8

BSO (25 μ M): Buthionine sulfoximine
 2-OHE₁ (10^{-8} M): 2-hydroxyestrone

5. Statut du gène suppresseur de tumeur *p53*

Un des gènes impliqué dans la stabilité du génome est le gène *p53*, et des mutations sur ce gène ont déjà été associées avec la résistance au MTX (Livingstone et al., 1992; Lücke-Huhle, 1994; Göker et al., 1995). Dans notre étude, l'implication possible du *p53* dans la résistance au MTX induite par les estrogènes a été déterminée par Western blot. Cet essai était utilisé afin de déterminer si le *p53* était encore actif en mesurant sa capacité de stimuler la transcription de *p21* à la suite d'une irradiation aux UVB.

La dose UVB requise pour augmenter le niveau basal de *p53* et stimuler la transcription du *p21* a été déterminée. La figure 31 illustre le faible niveau basal de *p53* chez les cellules MCF-7 en absence d'irradiation ou des estrogènes, et que 300 J/m² était la dose UVB minimale capable d'augmenter le *p53* et stimuler le *p21*. Les réponses de *p53* et de *p21* étaient déterminées respectivement 7 h et 15 h après

l'irradiation UVB. Pour obtenir des résultats fiables sur Western blot, une dose UVB de 400 J/m^2 a été choisie pour les expériences subséquentes.

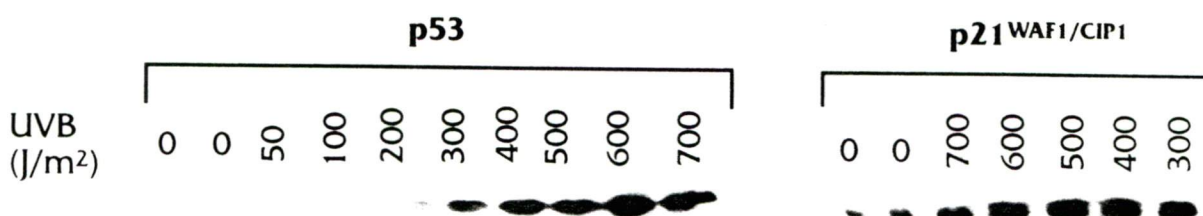


Figure 31. Illustration des niveaux de p53 et de p21 induits selon une échelle d'irradiation UVB allant de 0 à 700 J/m^2 . Protéines détectées par Western Blot.

Il est connu que l'estradiol stimule le niveau de p53 chez certaines lignées cellulaires tumorales mammaires humaines. Hors, les conditions expérimentales ont été optimisées afin de distinguer entre l'effet des UVB et des estrogènes sur le p53. Lorsque l'analyse était effectuée 5 h après l'addition de l'estradiol, le p53 était stimulé à un niveau équivalent à celui obtenu avec les UVB seuls ou avec la combinaison des UVB et de l'estradiol (Figure 32). La stimulation de p53 par l'estradiol était grandement réduite 24 h après l'addition de l'hormone ce qui permettait de déterminer l'effet spécifique des UVB. Ce temps d'exposition a été choisi pour l'étude sur les clones MTX-résistants induits par les estrogènes.

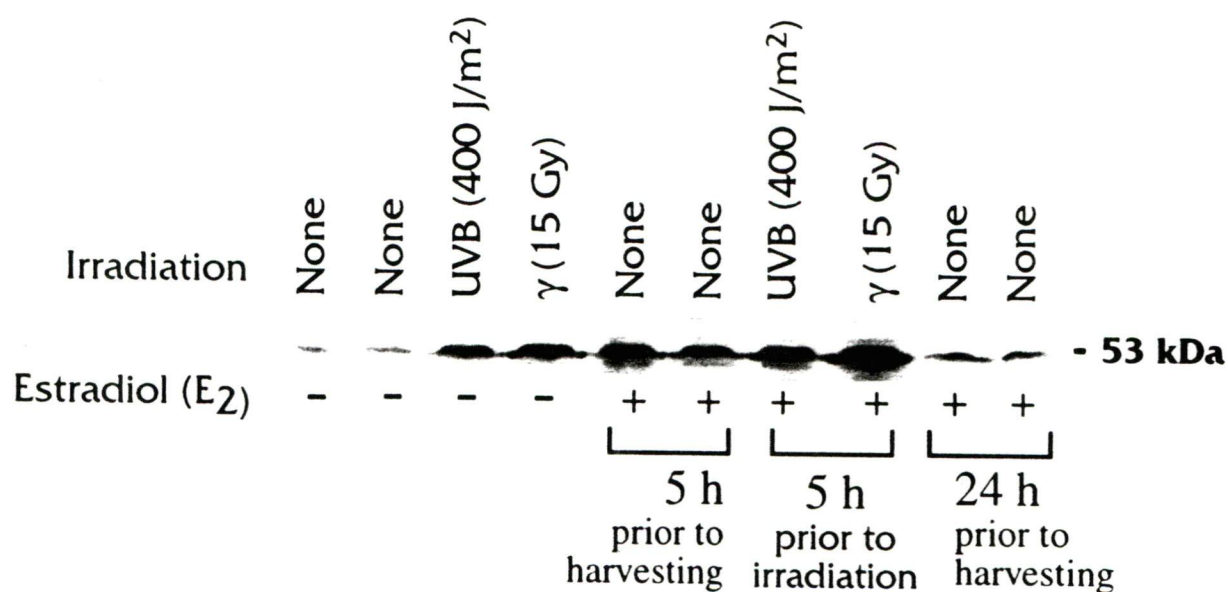


Figure 32. Stimulation de l'expression de p53 par les irradiations (UVB et γ) et l'estradiol. Protéines détectées par Western Blot.

La figure 33 illustre les réponses de p53 et de p21 obtenues après exposition aux estrogènes et aux radiations UVB chez les clones MTX-résistants induits par l'estradiol, le 2-hydroxyestrone et le 16 α -hydroxyestrone ainsi que chez les cellules MCF-7 parentales. Les résultats obtenus chez les clones MTX-résistants induits par le 4-hydroxyestrone étaient équivalents à ceux obtenus avec le 2-hydroxyestrone. Chez tous les clones MTX-résistants étudiés, l'analyse Western blot démontre que leurs protéines p53 étaient reconnues par l'anticorps anti-p53 DO-1. Ces protéines p53 étaient transcriptionnellement actives puisqu'elles ont stimulé la transcription de p21 après exposition aux UVB. Toutefois, l'accumulation de p53 en absence d'UVB était différente du niveau mesuré chez les cellules MCF-7 parentales.

Tous les estrogènes étudiés ont augmenté le niveau de p53 chez les cellules MCF-7 parentales, l'effet le plus élevé étant obtenu avec l'estradiol et le 16 α -hydroxyestrone. Chez les clones MTX-résistants, les niveaux de p53 en absence d'estrogènes étaient plus élevés que le niveau mesuré chez les cellules MCF-7 parentales. Pour les clones MTX-résistants induits par l'estradiol et le 16 α -hydroxyestrone, i.e. MTX^R-E₂ et MTX^R-16 α OHE₁, l'addition de leurs hormones respectives n'a augmenté que faiblement le niveau de p53. D'autre part, une amplification de 10-fois du p53 était induite par le 2-hydroxyestrone chez le clone MTX^R-2OHE₁.

Afin de déterminer si ce p53 induit par ces estrogènes chez les clones MTX-résistants était transcriptionnellement actif, nous avons vérifié si le p21 était stimulé par la combinaison des estrogènes et des UVB (400 J/m²). Chez les

clones MTX^R-E₂ et MTX^R-16 α -OHE₁, l'addition de leurs hormones respectives n'avait augmenté que faiblement le niveau de p53 de sorte à ne pouvoir transactiver le p21. Néanmoins, la combinaison des hormones et d'une irradiation UVB chez ces clones a induit significativement le p53 menant ainsi à une transactivation du p21. D'autre part, le niveau amplifié de p53 chez le clone MTX^R-2OHE₁ par le 2-hydroxyestrone n'a pu être stimulé d'avantage par la combinaison du 2-hydroxyestrone et des UVB. Ce niveau amplifié de p53 par le 2-hydroxyestrone était alors équivalent à la stimulation induite par le 2-hydroxyestrone et les UVB. La combinaison du 2-hydroxyestrone et des UVB a réussi à transactiver le p21 alors que la stimulation du p53 par le 2-hydroxyestrone seul n'a pas activé la transcription du p21. Ceci suggère ainsi que le p53 accumulé par le 2-hydroxyestrone chez le clone MTX^R-2OHE₁ était inactif.

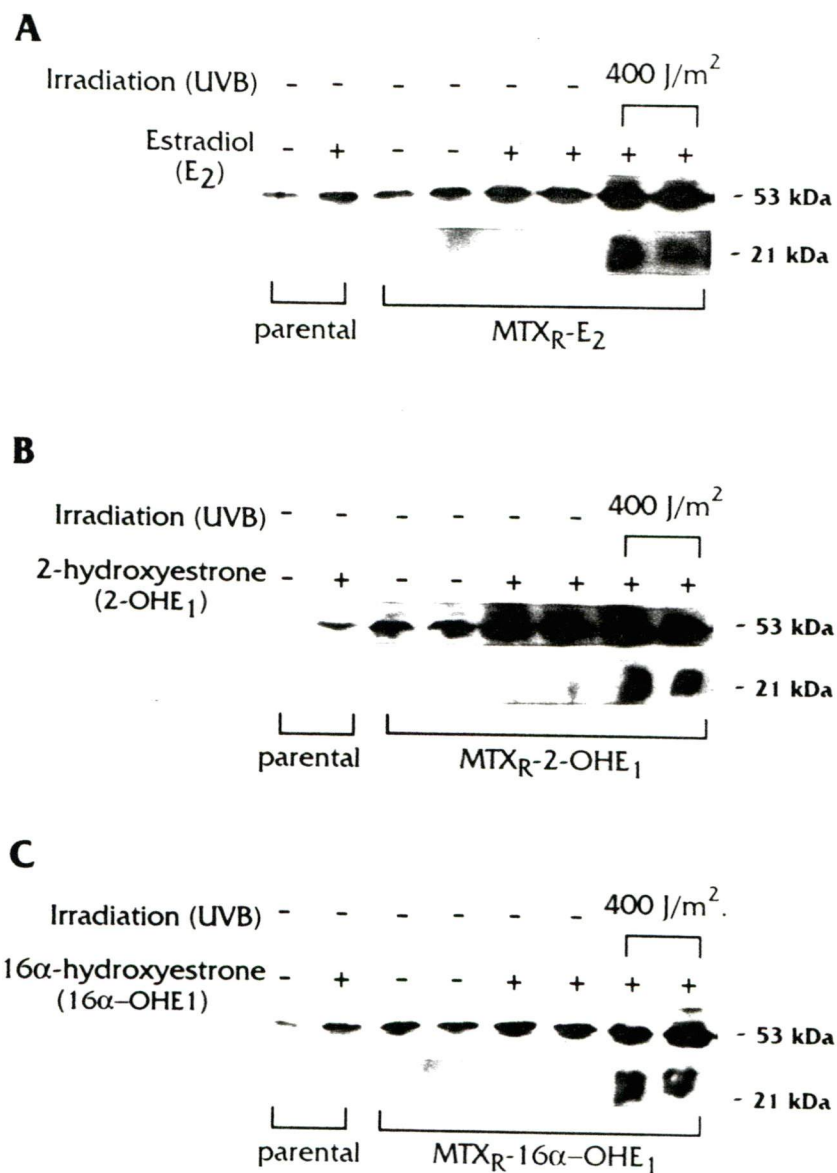


Figure 33. Gène *p53* chez les clones résistants au MTX:
 Détermination de son statut et effets des estrogènes
 Les protéines p53 et p21 ont été détectées par Western Blot.

IV. DISCUSSION

1. Amplification d'une résistance au MTX par les estrogènes.

La résistance aux agents chimiothérapeutiques est un obstacle majeur empêchant la rémission complète de patientes atteintes d'un cancer du sein, il devient alors important d'identifier des agents ou des conditions physiologiques capables de la moduler. L'estradiol a été identifié comme un facteur stimulant l'instabilité génomique chez les cellules de souris tumorigéniques 10T $\frac{1}{2}$ transformées par les radiations ionisantes, alors que le génome de cellules 10T $\frac{1}{2}$ non-tumorigéniques n'étaient pas affecté par l'hormone (Paquette, 1996). Cette présente étude démontre que l'estradiol et ses métabolites 2-, 4- et 16 α -hydroxyestrone ont stimulé le développement d'une résistance au MTX chez la lignée cancéreuse du sein MCF-7. En fait, sous ces conditions *in vitro*, les estrogènes les plus efficaces étaient le 4-hydroxyestrone et le 16 α -hydroxyestrone lesquels ont stimulé la résistance au MTX par un facteur d'amplification de 88. Le 2-hydroxyestrone démontre aussi un bon potentiel avec un facteur d'amplification de 33 fois, alors que l'estradiol démontre un faible effet avec un facteur d'amplification de seulement 3.2 fois. Contrairement aux autres études où la résistance au MTX était obtenue après une sélection ascendante de MTX (step-wise selection), l'événement responsable de cette résistance était induit lors d'une exposition aux estrogènes qui a duré seulement 12 divisions cellulaires. De plus, la sélection des cellules MTX-résistantes était effectuée en absence d'estrogènes; ce qui supporte que la résistance mesurée n'est pas le résultat d'une altération de la réponse

cellulaire au MTX causée par la présence de ces hormones. Cette amplification de la résistance au MTX ne peut être reliée à une différence dans le nombre de divisions cellulaires survenant lors de l'exposition aux hormones, puisqu'une variation de seulement 0.27 division cellulaire entre les différentes séries de boîtes de Pétris était mesurée à la fin de l'incubation avec les estrogènes.

Malgré le fait que la résistance au MTX survient fréquemment chez les cellules cancéreuses du sein, le mécanisme impliqué est toujours un sujet d'interrogations. Lors de cette investigation avec les clones MTX-résistants induits par les estrogènes, l'expression de cette résistance a été investiguée après le retrait des estrogènes. Durant la sélection au MTX ($9 \times LD_{50}$), des colonies résistantes ont émergées. Deux colonies résistantes formées par chacun des traitements aux différents estrogènes ont été isolées. Malgré le fait que ces cellules proliféraient dans le milieu de sélection, l'expression de la résistance au MTX était progressivement perdue et tous les clones cessaient progressivement de croître dans le milieu de sélection dans les trois semaines suivant leurs isolations.

Des clones résistants ont aussi été cultivés en parallèle en absence de MTX après l'essai Luria-Delbrück. Notre analyse de l'ADN par Southern blot à ce moment démontrait aucune amplification du gène *dhfr*. D'autre part, puisqu'il n'y avait pas suffisamment d'ADN dans les colonies initiales obtenues après l'essai Luria-Delbrück, et que l'expression de la résistance au MTX était perdue pendant les divisions cellulaires subséquentes, nous ne pouvons pas présentement déterminer si la perte de cette résistance au MTX peut être reliée à la perte de l'amplification génique. Nous pouvons toutefois affirmer que la résistance au MTX induite par les estrogènes est

réversible, et attribuer cette réversibilité au fait que l'amplification génique du *dhfr* est en elle-même réversible. Cette amplification peut être intrachromosomique ou se présenter sous forme de chromosomes double-minutes. Quoique la première forme d'amplification soit plus stable, il a été démontré que les deux types d'amplification du *dhfr* peuvent être perdues pendant les divisions cellulaires subséquentes (Mai, 1994).

Quoique qu'il en soit, nos résultats démontrent que l'exposition aux estrogènes est requise pour induire la résistance au MTX dans une fraction de la population de MCF-7. Le fait que la résistance soit réversible suggère que la présence des estrogènes est nécessaire pour maintenir l'expression de cette résistance.

2. Implication du récepteur des estrogènes.

Le récepteur des estrogènes (ER) est un facteur de transcription qui devient activé lorsque complexé avec un estrogène. Ce complexe stimule par la suite l'expression de gènes tel que *fos*, *jun* et *pS2* (Brown et al., 1984). Afin de déterminer le rôle du récepteur des estrogènes dans le développement de la résistance au MTX, le gène *pS2* a été utilisé comme marqueur de l'activité hormonale. Il a été rapporté que l'induction du *pS2* atteint un plateau après 3 à 6 jours d'incubation avec l'estradiol à 10^{-8} M avec les cellules MCF-7 (Westley et al., 1984). Sous ces conditions expérimentales, nous avons déterminé que les métabolites catéchols (i.e. 2- et 4-hydroxyestrone) n'ont pas stimulé le niveau de l'ARNm du *pS2* suggérant que ces deux estrogènes peuvent amplifier le développement d'une résistance au MTX par un

mécanisme indépendant de la voie du ER. Afin de déterminer si le ER est essentiel à l'induction de la résistance au MTX, des essais seront effectués avec une lignée cellulaire cancéreuse du sein avec ER-négatif. Ces résultats s'avéreront importants dans la détermination d'une induction possible de la résistance au MTX par le 2- et le 4-hydroxyestrone chez des tumeurs du sein ER-négatifs.

En ce qui concerne le 16 α -hydroxyestrone, une augmentation du niveau de l'ARNm du *pS2* était détectée à un degré semblable à celui de l'estradiol, suggérant que ces estrogènes peuvent induire une résistance au MTX par une voie impliquant le récepteur des estrogènes. D'un autre côté, l'effet du 16 α -hydroxyestrone ne peut être strictement lié à son action sur le récepteur des estrogènes. Des études sur la carcinogénèse induite par les estrogènes indiquent que la prolifération cellulaire peut jouer un rôle critique (Li et al., 1993). Chez les hamsters, l'apparition de tumeurs rénales induites par les estrogènes est reliée à l'habilité des estrogènes à induire la prolifération de cellules tubulaires proximales *in vitro* (Li et al., 1995). Toutefois, dans cette étude, les catécholestrogènes (i.e. les 2-, et 4-hydroxyestrone) n'ont pas été testés ce qui empêche la comparaison entre ceux-ci et le 16 α -hydroxyestrone. Dans des cultures cellulaires à court terme, le 16 α -hydroxyestrone se lie efficacement au récepteur des estrogènes et démontre une activité estrogénique presque aussi importante que l'estradiol, lorsque mesurée par la stimulation de la prolifération cellulaire et l'expression élevée du récepteur de la progestérone (Li et al., 1995). Toutefois, lors d'incubation à long terme, le 16 α -hydroxyestrone forme des associations covalentes avec les récepteurs des estrogènes, ce qui produit une

diminution marquée de ces activités estrogéniques. Cette liaison irréversible au récepteur des estrogènes a été suggérée comme un mécanisme responsable de la transformation maligne chez les tissus ciblés par cet estrogène (Miyairi et al., 1991; Swaneck et Fishman, 1988). En fait, chez la lignée épithéliale mammaire de souris C57/MG, le 16 α -hydroxyestrone induit une transformation (tel que détecté par la croissance sur agar), une hyperprolifération, et des dommages à l'ADN plus fortement que l'estradiol ou l'estriol (Telang et al., 1992). Dans notre essai Luria-Delbrück, le 16 α -hydroxyestrone était incubé pendant 10 jours. Alors, nous ne pouvons exclure que l'incidence de la résistance au MTX chez les cellules MCF-7 était une combinaison d'activité estrogénique et d'effet génotoxique.

En ce qui concerne les métabolites 2- et 4-hydroxyestrone, ces estrogènes peuvent agir comme carcinogènes chimiques en générant des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou en se liant à des macromolécules cellulaires (Liehr, 1990). Les stéroïdes endogènes estrone et estradiol sont hydroxylés par les enzymes des cytochromes P450 à différentes positions tels que sur les carbones 2, 4, et 16 pour former les 2- et 4-hydroxyestrone (i.e. les métabolites catéchols), et le 16 α -hydroxyestrone. Les métabolites catéchols sont oxydés en semiquinones et puis en o-quinones, lesquels peuvent entreprendre un cycle rédox médié par la cytochrome P450 oxydase/P450 réductase. Ce cycle rédox produit des ERO capables d'induire des dommages oxydatifs à l'ADN. Ces dommages oxydatifs pourraient être impliqués dans la formation de mutations dans des gènes critiques pour le maintien du génome (e.g. le gène suppresseur de tumeur *p53*), menant ainsi à l'accumulation de modifications supplémentaires à l'ADN. Une deuxième possibilité est que ces ERO

produits par le 2- et le 4-hydroxyestrone pourraient activer un élément de réponse antioxydant (ARE) retrouvé dans la séquence promotrice de gènes impliqués dans la stabilité du génome (Prester et Talalay, 1995).

3. Implication des ERO dans la résistance au MTX.

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont continuellement générés par des facteurs exogènes et même par des molécules ou des processus d'oxydo-réduction endogènes. Les systèmes de défense antioxydante ont co-évolué avec le métabolisme aérobique afin de contrer le dommage oxydatif produit par les ERO. Malgré la défense antioxydante, les dommages créés par les ERO aux macromolécules cellulaires telles que les protéines, les lipides membranaires et l'ADN s'accumulent durant la vie.

Parmi les facteurs endogènes pouvant générer des ERO, les hormones ovariennes estrogènes ont été identifiées (Liehr et al., 1986). Lors du métabolisme de ceux-ci, l'estradiol et l'estrone peuvent subir des réactions d'hydroxylation en position C2 et C4 sur l'anneau A menant à la formation des catécholestrogènes (CE) (Spicer et Hammond, 1989). Les catécholestrogènes peuvent être métabolisés par un cycle rédox entre les formes hydroquinones (catéchols) et quinones via la formation intermédiaire de radicaux semiquinones. L'oxydation des hydroquinones est catalysée par les enzymes des cytochromes P-450.

Afin de vérifier si les ERO générés par les catécholestrogènes pouvaient induire un stress oxydatif, le niveau de l'antioxydant glutathion (GSH) a été mesuré. Le clone MTX^R-2OHE₁ a donc été incubé en présence du 2-hydroxyestrone (2-OHE₁)

et son dérivé méthylé, 2-méthoxyestrone (2-MeOHE₁), qui est incapable de générer des ERO. Nos résultats démontrent que le 2-OHE₁ a augmenté le niveau du GSH d'un facteur 2.07 fois, alors que le 2-MeOHE₁ n'a eu aucun effet. Le fait que le GSH sert de défense contre les ERO et que le 2-OHE₁ stimule son niveau, ces résultats suggèrent alors que la stimulation du niveau de GSH est due à un stress oxydatif induit par le 2-OHE₁.

Dans le but de déterminer si les ERO formés par les catécholestrogènes peuvent être impliqués dans la résistance au MTX, nous avons effectué un essai Luria-Delbrück avec le buthionine sulfoximine (BSO). Le BSO est un inhibiteur de la γ -glutamyl-cystéine synthétase, l'étape limitante de la synthèse du GSH. Nos résultats démontrent que le 2-OHE₁ seul amplifie la résistance au MTX de 33 fois par rapport au contrôle, alors que le 2-OHE₁ après traitement au BSO amène un facteur d'amplification de 427.8. Les métabolites catéchols 2-hydroxyestrone et possiblement le 4-hydroxyestrone semblent donc amplifier la résistance au MTX par la formation de ERO.

Pendant la dernière décennie, un intérêt s'est accumulé pour étudier le rôle possible des ERO dans la promotion tumorale. De plus en plus, les données supportent l'idée que les ERO sont importants dans la promotion *in vivo* aussi bien que *in vitro*. Il y a des évidences que les ERO induisent des mutations reliés à la formation de dommages à l'ADN tels que les cassures simple-brins et double-brins chez les eucaryotes (Troll et Wiesner, 1985; Hsie et al., 1986; Sun, 1990). L'implication des ERO au niveau de la résistance au MTX par l'amplification génique du *dhfr*, est soutenue par l'étude du groupe de Hahn. Ils ont démontré qu'à la suite d'une

irradiation de 1000 cGy aux rayons-X, la résistance au MTX augmentait de plus de 1000 fois comparativement aux cellules de souris EMT-6 non-irradiées (Hahn et al., 1990).

Dans notre système, le cycle rédox des estrogènes peut se produire dans le cytosol ainsi que dans le noyau, entraînant des conséquences différentes pour chacune des deux étapes. Dans l'avenue où une partie du cycle rédox des catécholestrogènes se produirait dans le cytosol, il se pourrait alors qu'il y ait une accumulation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) due à une protection déficiente des enzymes antioxydants (glutathion peroxydase, et catalase). Il est connu que les cellules cancéreuses du sein MCF-7 ont un niveau faible de glutathion peroxydase (GPx) (Esworthy et al., 1995). Plusieurs études *in vivo* ont aussi démontré qu'une administration des estrogènes avait comme effet de diminuer les deux enzymes antioxydants nommés précédemment (Roy et Liehr, 1988a; Roy et Liehr, 1988b; Roy et Liehr, 1989; Segura-Aguilar et al., 1990). Cette accumulation de H_2O_2 pourrait transactiver indirectement certains gènes via un élément de réponse antioxydant (ARE). Certains suggèrent que ce ARE répond aux ERO représentant alors une partie de la voie de signalisation qui permet aux cellules eucaryotes de répondre au stress oxydatif (Rushmore et al., 1991; Prestera et Talalay, 1995; Mulcahy et Gipp, 1995). Plusieurs études ont aussi démontré que le H_2O_2 peut activer ces ARE par l'intermédiaire du facteur de transcription NF- κ B (Schreck et al., 1992; Meyer et al., 1993; Das et al., 1995; Kretz-Remy et al., 1996). La principale forme de NF- κ B semble être un hétérodimère consistant de sous-unités 50- et 65-kDa. L'hétérodimère est lié à une protéine inhibitrice I κ B dans le cytoplasme. En

réponse à une variété de stimuli (e.g. H_2O_2 , $TNF-\alpha$), le $I\kappa B$ se dissocie du complexe hétérodimérique, permettant au $NF-\kappa B$ de migrer au noyau et activer l'expression génique. Une surexpression de la glutathion peroxydase chez des cellules cancéreuses du sein T47D inhibe la phosphorylation de $I\kappa B$, confirmant ainsi le rôle du H_2O_2 dans l'activation de $NF-\kappa B$ (Kretz-Remy et al., 1996). Afin de déterminer plus en détails le rôle des ERO générés par les catécholestrogènes dans la résistance au MTX, des essais seront effectués afin de bloquer leurs effets avec des antioxydants (tels que mannitol, DMSO, desferrioxamine, catalase, BCS) ou d'augmenter leurs effets avec d'autres inhibiteurs que le BSO (COMT, aminotriazole).

En ce qui concerne le cycle rédox des catécholestrogènes au niveau du noyau, le H_2O_2 généré peut endommager l'ADN en produisant des cassures simple-brins (Djuric et al., 1993). Ces cassures simple-brins sont possiblement le résultat d'une réaction de Fenton avec des ions Cu^+ liés aux guanines, générant alors le radical hydroxyl OH^\bullet . Par conséquent, ce dernier peut former le 8-oxo-désoxyguanosine, lequel est un marqueur mutagénique du dommage oxydatif à l'ADN (Li et al., 1994). De plus, les enzymes oxydase/réductase du cytochrome P450 impliqué dans le cycle rédox des estrogènes ne sont pas présents dans le noyau, ce qui implique que la génération de ERO est assuré par le cuivre.

4. Statut du gène suppresseur de tumeur *p53*.

L'amplification de la résistance au MTX induite par les estrogènes peut être le résultat de la génération de ERO par les métabolites de l'estradiol, i.e. les catécholestrogènes, comme suggéré dans section précédente. Les ERO générés par ces métabolites peuvent, en plus d'avoir échappé à la défense cellulaire antioxydante, créer des mutations dans des gènes critiques pour le maintien de l'intégrité du génome menant ainsi au dérèglement d'événements qui contrôlent la croissance et le développement normal cellulaire. Ces mutations surviennent dans deux classes de gènes: ceux qui facilitent la croissance cellulaire et la formation de tumeurs, dans lesquels une mutation ou une surexpression est oncogénique (e.g. *myc*, *ras*), et ceux qui inhibent ces processus (les gènes suppresseurs de tumeurs) dont la perte est oncogénique (e.g. *p53*, *Rb*).

Parmi les gènes qui sont associés avec la résistance au MTX et dont l'expression est modulée par les estrogènes, l'oncogène *c-myc* et le gène suppresseur de tumeur *p53* semblent particulièrement intéressants. Il a été rapporté que la surexpression de *c-myc* précède l'amplification du gène *dhfr* (Mai, 1994), et d'un autre côté, il est aussi connu que l'estradiol peut stimuler son expression (Dubik et al., 1987; Dubik et Shiu, 1988). Toutefois, aucune corrélation entre cette stimulation de *c-myc* par les estrogènes et l'amplification de gène *dhfr* n'a été rapportée, ainsi que l'implication du 2-, 4- et 16 α -hydroxyestrone dans ce processus.

Dans le but de déterminer le statut du gène suppresseur de tumeur *p53* chez les clones MTX-résistants induits par les estrogènes, nous avons effectué une analyse

Western. Le gène *p53* est reconnu pour être important dans la stabilité du génome, et certaines études ont rapporté une association entre l'apparition de la résistance au MTX et des mutations sur le gène *p53* (Livingstone et al., 1992; Yin et al., 1992; Göker et al., 1995). Nos résultats suggèrent que le *p53* est toujours présent chez tous nos clones MTX-résistants étudiés, et ils peuvent activé la transcription du gène *p21* après irradiation UVB. Toutefois, le comportement de *p53* était altéré comparativement aux cellules MCF-7 parentales. En fait, le niveau basal de *p53* était amplifié chez tous les clones MTX-résistants. Ce niveau était augmenté de 10 fois suivant l'addition du 2-hydroxyestrone. De plus, ce niveau amplifié de *p53* par le 2-hydroxyestrone était équivalent à la stimulation induite par le 2-hydroxyestrone et les UVB. La combinaison du 2-hydroxyestrone et des UVB a réussi à transactiver le *p21* alors que la stimulation du *p53* par le 2-hydroxyestrone seul n'a pas activer la transcription du *p21*. Ceci suggère que le *p53* accumulé par le 2-hydroxyestrone chez le clone MTX^R-2OHE₁ est inactif et que des modifications génomiques induites durant l'incubation avec le 2-hydroxyestrone pourraient avoir altéré le comportement du *p53*. Une étude récente a démontré que le salicylate de sodium, un inhibiteur des protéines kinases, inhibe l'activation transcriptionnelle du *p53*, sans toutefois inhiber l'accumulation de la protéine (Chernov et Stark, 1997). Il se pourrait donc que les estrogènes, particulièrement le 2-hydroxyestrone, agissent de la même façon que le salicylate de sodium. Ce qui amènerai une inhibition de l'activation transcriptionnelle du *p53* sans toutefois inhiber son accumulation, et que les UVB amène une activation transcriptionnelle du *p53* par une autre voie que les protéines kinases.

L'accumulation de p53 est stimulée par les ERO générés par les radiations ionisantes (Leonard et al., 1995; Selivanova et Wiman, 1995; Ko et Prives, 1996) et nous avons démontré que les ERO sont aussi produits par le 2- et 4-hydroxyestrone, ce qui pourrait mener à cette accumulation du p53. Par conséquent, une mutation dans le système de défense contre le stress oxydatif pourrait résulter en une forte accumulation de p53 en présence du 2- et 4-hydroxyestrone.

V. CONCLUSION

Dans cette présente étude, nous avons démontré que l'estradiol et ses métabolites 2-, 4- et 16 α -hydroxyestrone ont stimulé le développement d'une résistance au MTX chez la lignée cellulaire cancéreuse du sein MCF-7. En effet, sous ces conditions *in vitro*, les estrogènes les plus efficaces étaient le 4-hydroxyestrone et le 16 α -hydroxyestrone. Le 2-hydroxyestrone a démontré aussi un bon potentiel alors que l'estradiol a démontré un faible effet. Cette résistance au MTX induite par les estrogènes est réversible, phénomène qui pourrait être attribuer au fait que l'amplification génique du *dhfr* ciblé par le MTX est en elle-même réversible. Cette réversibilité suggère que la présence des estrogènes est nécessaire pour maintenir l'expression de cette résistance.

Les résultats obtenus avec le 16 α -OHE₁ et l'E₂ démontrent que ce développement d'une résistance au MTX peut impliquer le récepteur des estrogènes (ER) tel que détecté par la stimulation du gène *pS2*, un marqueur de l'activité estrogénique. D'un autre côté, les métabolites catéchols (2- et 4-hydroxyestrone) n'ont pas stimulé le niveau de l'ARNm du *pS2* indiquant que ces deux estrogènes peuvent amplifier le développement d'une résistance au MTX par un mécanisme indépendant de la voie du ER. Par conséquent, l'induction de la résistance au MTX par le 2- et 4-hydroxyestrone pourrait apparaître chez des tumeurs du sein ER-négatifs.

Nous proposons que les catécholestrogènes agissent par l'intermédiaire de la formation de ERO capables d'induire des dommages oxydatifs à l'ADN. En effet, nos résultats démontrent que le 2-OHE₁ a augmenté le niveau du GSH. Le fait que le GSH

sert de défense contre les ERO et que le 2-OHE₁ stimule son niveau, suggère que la stimulation du niveau du GSH est due à un stress oxydatif. A l'aide d'un inhibiteur de la synthèse du GSH, le 2-OHE₁ a augmenté l'apparition d'une résistance au MTX appuyant ainsi que les catécholestrogènes amplifie la résistance par la formation de ERO. En plus de générer des ERO, nos résultats démontrent que le 2-OHE₁ amplifie le niveau du *p53* mais sans stimulation du *p21*, qualifiant ainsi ce *p53* de transcriptionnellement inactif. Des modifications génomiques induites durant l'incubation avec les estrogènes pourraient avoir altéré son comportement. Ce résultat indique que l'exposition aux estrogènes pourrait avoir modifié des gènes critiques pour le maintien de l'intégrité du génome.

La résistance aux agents chimiothérapeutiques est un facteur majeur limitant l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques, l'inhibition de cette résistance induite par les estrogènes à l'aide d'antiestrogènes et/ou d'antioxydants pourrait améliorer le sort des patientes atteintes du cancer du sein.

RÉFÉRENCES

- Arrick B.A., Nathan C.F. (1984) Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy. *Can. Res.* 44 : 4224-4232
- Baniahmad C., Nawaz Z., Baniahmad A., Gleeson M.A.G., Tsai M.J. O'Malley B.W. (1995) Enhancement of human estrogen receptor activity by SPT6: a potential coactivator. *Mol. Endocrinol.* 9 : 34-43
- Barrett J.C. (1993) Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 100 : 9-12
- Bebbington C.R., Hentschel C.C.G. (1987) The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells. In: Glover D.M., ed. *DNA Cloning a practical approach Volume III*. Washington D.C. IRL Press 163-188
- Bernstein L., Pike M.C., Ross R.K., Judd H.L., Brown J.B., Henderson B.E. (1985) Estrogen and sex hormone-binding globulin levels in nulliparous and parous women. *J. Natl. Can. Inst.* 74 : 741-745
- Bernstein L., Ross R.K. (1993) Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol. Rev.* 15 : 48-65

Berry M., Nunez A.M., Chambon P. (1989) Estrogen-responsive element of the human *pS2* gene is an imperfectly palindromic sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 1218-1222

Bertino J.R., Göker E., Gorlick R., Li W.W., Banerjee D. (1996) Resistance mechanisms to methotrexate in tumors. *Stem Cells* 14 : 5-9

Bohen S.P., Kralli A., Yamamoto K.R. (1995) Hold'em and Fold'em: Chaperones and signal transduction. *Science* 268 : 1303-1304

Borras M., Jin L., Bouhoute A., Legros N., et Leclercq G. (1994) Evaluation of estrogen receptor, antiestrogen binding sites and calmodulin for antiestrogen resistance of two clones derived from the MCF-7 breast cancer cell line. *Biochem. Pharm.* 48 : 2015-2024

Boudreau F., Blais S., Asselin C. (1996) Regulation of CAAT/Enhancer binding protein isoforms by serum and glucocorticoids in the rat intestinal epithelial crypt cell line IEC-6. *Exp. Cell Res.* 222 : 1-9

Brown P.C., Tlsty T.D., Schimke R.T. (1983) Enhancement of methotrexate resistance and dihydrofolate reductase gene amplification by treatment of mouse 3T6 cells with hydroxyurea. *Mol. Cell. Biol.* 3 : 1097-1107

Brown A.M.C., Jeltsch J.M., Roberts M., Chambon P. (1984) Activation of *pS2* gene transcription is a primary response to estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 6344-6348

Bucala R., Cerami A. (1983) Characterization of antisera to the addition product formed by the non-enzymatic reaction of with 16 α -hydroxyestrone with albumin. *Molec. Immun.* 20 : 1289-1292

Bucala R., Fishman J., Cerami A. (1984) The reaction of 16 α -hydroxyestrone with erythrocytes in vitro and in vivo. *Eur. J. Biochem.* 140 : 593-598

Bucala R., Ulrich P.C., Chaitt B.T., Bencsath F.A., Cerami A. (1986) Structure of lysine adducts with 16 α -hydroxyestrone and cortisol. *J. Steroid Biochem.* 25 : 127-133

Burdon R.H., Rice-Evans C. (1989) Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radical Res. Commun.* 6 : 345-358

Cameron C. (1990) Breast cancer incidence and mortality. 30 : 1517-1518

Capizzi R.L., et Jameson J.W. (1973) A table for the estimation of the spontaneous mutation rate of cells in culture. *Mut. Res.* 17 : 147-148

Carman M.D., Schornagel J.H., Rivest R.S., Srimatkandada S., Portlock C.S., Duffy T., Bertino J.R. (1984) Resistance to methotrexate due to gene amplification in a patient with acute leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2 : 16-20

Carroll S.M., DeRose M.L., Gaudray P. (1988) Double minute chromosomes can be produced from precursors derived from a chromosomal deletion. *Mol. Cell. Biol.* 8 : 1525-1533

Cavaillès V., Dauvois S., Danielian P.S., Parker M.G. (1994) Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 10009-10013

Chambraud B., Berry M., Redeuilh G., Chambon P., Baulieu E.E. (1990) Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J. Biol. Chem.* 265 : 20686-20691

Chen M.J., Shimada T., Moulton A.D., Cline A., Humphries R.K., Maizel J., Nienhuis A.W. (1984) The functional human dihydrofolate reductase gene. *J. Biol. Chem.* 259 : 3933-3943

Chernov M.V., Stark G.R. (1997) The p53 activation and apoptosis induced by DNA damage are reversibly inhibited by salicylate. *Oncogene* 14 : 2503-2510

Chomczynski P., et Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156-159

Cooper T.G. (1977) *The tools of biochemistry.* John Wiley and Sons, New York, NY

Cowan K.H., Goldsmith M.E., Levine R.M., Aitken S.C., Douglass E., Clendeninn N., Nienhuis A.W., Lippman M.E. (1982) Dihydrofolate reductase gene amplification and possible rearrangement in estrogen-responsive methotrexate-resistant human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 257 : 15079-15086

Cox L.S., Lane D.P. (1995) Tumour suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *Bioessays* 17 : 501-508

Danielan P.S., White R., Lees J.A., Parker M.G. (1992) Identification of a conserved region required for hormone dependant transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* 11 : 1025-1033

Darbon J.M., Fesquet D., Cavadore J.C. (1995) De nouveaux régulateurs du cycle cellulaire: les protéines modulatrices des complexes cdk-cyclines. *Médecine/Sciences* 11 : 349-356

Das K.C., Lewis-Molock Y., White C.W. (1995) Activation of NF- κ B and elevation of MnSOD gene expression by thiol reducing agents in lung adenocarcinoma (A549) cells. *Am. J. Physiol.* 269 : L588-L602

Djuric Z., Everett C.K., Luongo D.A. (1993) Toxicity, single-strand breaks, and 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine formation in human breast epithelial cells treated with hydrogen peroxide. *Free Rad. Biol. Med.* 14 : 541-547

Donehower L.A., Bradley A. (1993) The tumor suppressor p53. *Biochem. Biophys. Acta* 1155 : 181-205

Dubik D., Dembinski T.C., Shiu R.P.C. (1987) Stimulation of c-myc oncogene expression associated with estrogen-induced proliferation of human breast cancer. *Can. Res.* 47 :6517-6521

Dubik D., Shiu R.P.C. (1988) Transcriptional regulation of c-myc oncogene expression by estrogen in hormone-responsive human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 263 :12705-12708

Dreher D., Junod A.F. (1996) Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Can.* 32A : 30-38

Ellis J.R., Van der Vies S.M. (1991) Molecular Chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60 : 321-347

Engelsman E., Persijn J.P., Korsten C.B., Cleton F.J. (1973) Oestrogen receptors in human breast cancer tissue and response to endocrine therapy. *Brit. Med. J.* 2 : 750-752

Esworthy R.S., Baker M.A., Chu F.F. (1995) Expression of selenium-dependent glutathione peroxidase in human breast tumor cell lines. *Can. Res.* 55 : 957-962

Evan R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 24 : 889-895

Farber S., Diamond L., Mercer R. (1948) Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). *N. Engl. J. Med.* 238 : 787-793

Fawell S.E., Lees J.A., White R., Parker M.G. (1990) Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell* 60 : 953-962

Fishman J., Schneider J., Hershcopf R.J., Bradlow H.L. (1984) Increased estrogen 16 α -hydroxylase activity in women with breast and endometrial cancer. J. Steroid Biochem. 20 : 1077-1081

Fleming G.F., Schilsky R.L. (1992) Antifolates: The next generation. Sem. In Oncol. 19 : 709-719

Fuller P.J. (1991) The steroid receptor superfamily: mechanism of diversity. FASEB J. 5 : 3092-3099

Göker E., Waltham M., Kheradpour A., Tripett T., Mazumdar M., Elisseyeff Y., Schnieders B., Steinherz P., Tan C., Berman E., Bertino J.R. (1995) Amplification of the dihydrofolate reductase gene is a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphoblastic leukemia and is correlated with p53 gene mutations. Blood 86 : 677-684

Habel L.A., Stanford J.L. (1993) Hormone receptors and breast cancer. Epidemiol. Rev. 15 : 209-219

Hahn P., Nevaldine B., Morgan W.F. (1990) X-ray induction of methotrexate resistance due to *dhfr* gene amplification. Som. Cell Mol. Gen. 16 : 413-423

- Halachmi S., Marden E., Martin G., MacKay H., Abbondanza C., Brown M. (1994) Estrogen-receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* 264 : 1455-1458
- Hall A.R., Milner J. (1997) Specific p53-DNA complexes contain an mdm-2 related protein. *Oncogene* 4 : 1371-1376
- Hall J.M., Lee M.K., Newman B., Morrow J.E., Anderson L.A., Huey B., King M.C. (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250 :1684-1689
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1989) Free radicals in biology and medicine. 2nd edition Oxford Press p.469
- Halliwell B. (1994) Free radicals and antioxidants: a general view. *Nutr. Rev.* 52 : 253-265
- Halliwell B. (1996) Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie-Biologie* 44 : 6-13
- Harris J.R., Lippman M.E., Veronesi U., Willett W. (1992) Breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 327 : 319-480

Henderson B.E., Ross R., Bernstein L. (1988) Estrogens as a cause of human cancer: The Richard and Linda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Can. Res.* 48 : 246-253

Hendrick J.P., Hartl F.U. (1993) Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62 : 349-384

Horns R.C., Dower W.J., Schimke R.T. (1984) Gene amplification in a leukemic patient treated with methotrexate. *J. Clin. Oncol.* 2 : 2-7

Hunt J.D., Valentine M., Tereba A. (1990) Excision of *N-myc* from a chromosome 2 in human neuroblastoma cells containing amplified *N-myc* sequences. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 823-829

Hsie A.W., Recio L., Katz D.S., Lee C.Q., Wagner M., Schenley R.L. (1986) Evidence for reactive oxygen species inducing mutations in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 9616-9620

Ince B.A., Schodin D.J., Shapiro D.J., Katzenellenbogen B.S. (1995) Repression of endogenous estrogen receptor activity in MCF-7 human breast cancer cells by dominant negative estrogen receptors. *Endocrinology* 136 : 3194-3199

Jensen E.V.(1980) Steroid receptors in breast cancer: an NIH Consensus Development Conference. *Cancer* 46 (Suppl.) : 2959-2963

Key T.J.A., Chen J., Wang D.Y., Pike M.C., Boreham J. (1990) Sex hormones in women in rural China and in Britain. *Brit. J. Can.* 62 : 631-636

Kirkman H. (1959) Estrogen-induced tumors of the kidney in the Syrian hamster. III. Growth characteristics in the Syrian hamster. *Natl. Can. Inst. Monogr.* 1 : 1-57

Klug A., Rhodes D. (1987) 'Zinc Fingers': a novel motif for nucleic acid recognition. *TIBS* 12 : 464-469

Ko L.J., Prives C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10 : 1054-1072

Kretz-Remy C., Mehlen P., Mirault M.E., Arrigo A.P. (1996) Inhibition of I κ B- α phosphorylation and degradation and subsequent NF- κ B activation by glutathione peroxidase overexpression. *J. Cell Biol.* 133 : 1083-1093

Kumar V., Green S., Stack G., Berry M., Jin J.R., Chambon P. (1987) Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51 : 941-951

Kumar V., Chambon P. (1988) The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 55 : 145-156

Lane D.P. (1992) p53, guardian of the genome. *Nature* 358 : 15-16

Lee S.H. (1979) Cancer cell estrogen receptor of human mammary carcinoma. *Cancer* 44 : 1-12

Lee Davis D., Bradlow L. (1995) Estrogènes et cancer. *Pour la science* 218 : 74-80

Lemieux P., Fuqua S. (1996) The role of the estrogen receptor in tumor progression. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 56 : 87-91

Leonard C.J., Cannman C.E., Kastan M.B. (1995) The role of p53 in cell-cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Imp. Adv. Oncol.* 32 : 33-40

Leung B.S., Fletcher W.S., Lindell T.D., Wood D.C. (1973) Predictability of response to endocrine ablation in advanced breast carcinoma. *Arch. Surg.* 106 : 515-519

Levine R.M., Rubalcaba E., Lippman M.E., Cowan K.H. (1985) Effects of estrogen and tamoxifen on the regulation of dihydrofolate reductase gene expression in a human breast cancer cell line. *Can. Res.* 45 : 1644-1650

Li J.J., Gonzalez A., Banerjee S., Banerjee S.K., Li S.A. (1993) Estrogen carcinogenesis in the hamster kidney: role of cytotoxicity and cell proliferation. *Environ. Health Perspect.* 101 Suppl. 5 : 259-264

Li J.J., Li S.A., Oberley T.D., Parsons J.A. (1995) Carcinogenic activities of various steroidal and nonsteroidal estrogens in the hamster kidney: relation to hormonal activity and cell proliferation. *Can. Res.* 55 : 4347-4351

Li Y., Trush M.A., Yager J.D. (1994) DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxy catechol of estradiol. *Carcinogenesis* 15 : 1421-1427

Liehr J.G., Ulubelen A.A., Strobel H.W. (1986) Cytochrome P450-mediated redox cycling of estrogens. *J. Biol. Chem.* 261 : 16865-16870

Liehr J.G., Roy D. (1990) Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radical Biol. Med.* 8 : 415-423

Livingstone L.R., White A., Sprouse J., Livanos E., Jacks T., Tlsty T.D. (1992) Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 70 : 923-935

Loeb L.A. (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Can. Res.* 51 : 3075-3079

Lowe S.W., Ruley H.E., Jacks T., Housman D.E. (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74 : 957-967

Lücke-Huhle C. (1994) Permissivity for methotrexate-induced DHFR gene amplification correlates with the metastatic potential of rat adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 15 : 695-700

Luria S.E., Delbrück M. (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28 : 491-511

Maas H., Engel B., Hohmeister H., Lehman F., Trams G. (1972) Estrogen receptors in human breast cancer tissue. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 113 : 377-382

Maas H., Trams G. (1973) Oestrogen receptors in human breast cancer tissue. In: Davis W., Maltoni C. eds. *Proceedings 5th International Symposium on the Biological Characterization of Human Tumours*, Bologna. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation. 203-207

Mai S. (1994) Overexpression of *c-myc* precedes amplification of the gene encoding dihydrofolate reductase. *Gene* 148 : 253-260

Mans D.R.A., Schuurhuis G.J., Treskes M., Lafleur M.V.M., Retèl J., Pinedo H.M., Lankelman J. (1992) Modulation by D,L-buthionine-S,R-sulphoximine of etoposide cytotoxicity on human non-small cell lung, ovarian and breast carcinoma cell lines. *Eur. J. Can.* 28A : 1447-1452

Martucci C.P., Fishman J. (1993) P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmac. Ther.* 57 : 237-257

Masiakowski P., Breathnach R., Bloch J., Gannon F., Krust A., et Chambon P. (1982) Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res.* 10 : 7895-7903

Maurer B.J., Barker P.E., Masters J.N., Ruddle F.H., Attardi G. (1984) Human dihydrofolate reductase gene is located in chromosome 5 and is unlinked to the related pseudogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 1484-1488

McDonnell D.P., Vegeto E., O'Malley B.W. (1992) Identification of a negative regulatory function for steroid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 10563-10567

McKenzie K. (1996) Molecular genetics of human breast cancer. *Prog. Clin. Biol. Res.* 394 : 183-209

Meister A., Anderson M.E. (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52 : 711-760

Melera P.W. (1991) Acquired versus inquired resistance to methotrexate: diversity of the drug-resistant phenotype in mammalian cells. *Can. Biol.* 2 : 245-255

Meyer M., Schreck R., Baeuerle P.A. (1993) H_2O_2 and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* 12 : 2005-2015

Miller J., McLachlan A.D., Klug A. (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4 : 1609-1614

Miyairi S., Ichikawa T., Nambara T. (1991) Structure of the adduct of 16α -hydroxyestrone with a primary amine: evidence for the Heyns rearrangement of steroidal D-ring α -hydroimines. *Steroids* 56 : 361-366

Momand J., Zambetti G.P., Olson D.C., George D., Levine A.J. (1992) The *mdm-2* oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69 : 1237-1245

Moore J.W., Keu T.J.A., Bulbrook R.D., Clark G.M.G., Allen D.S., Wang D.Y., Pike M.C. (1987) Sex hormone-binding globulin and risk factors for breast cancer

in a population of normal women who had never used exogenous sex hormones.
Brit. J. Can. 56 : 661-666

Mulcahy R.T., Gipp J.J. (1995) Identification of a putative antioxidant response element in the 5'-flanking region of the human γ -glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. Bioch. Biophys. Res. Commun. 209 : 227-233

Nutter L.M., Wu Y.Y., Ngo E.O., Sierra E.E., Guteierrez P.L., Abul-Hajj Y.J. (1994) An o-quinone form of estrogen produces free radicals in human breast cancer cells: correlation with DNA damage. Chem. Res. Toxicol. 7 : 23-28

Oliner J.D., Kinzler K.W., Meltzer P.S., George D.L., Vogelstein B. (1992) Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. Nature 358 : 80- 83

Paquette B. (1996) Enhancement of genomic instability by 17 β -estradiol in minisatellites sequences of X-ray-transformed mouse 10T $\frac{1}{2}$ cells. Carcinogenesis 17 : 1221-1225

Pike M.C. (1993) Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation and breast cancer risk. Epidemiol. Rev. 15 : 17-35

- Ponglikitmongkol M., Green S., Chambon P. (1988) Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J.* 7 : 3385-3388
- Pratt W.S.P. (1990) Interaction of hsp90 with steroid receptors: organizing some diverse observations and presenting the newest concepts. *Mol. Cell. Endo.* 74 : C69-C76
- Prester T., Talalay P. (1995) Electrophile and antioxidant regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 8965-8969
- Preston-Martin S., Pike M.C., Ross R.K., Jones P.A., Henderson B.E. (1990) Increased cell division as a cause of human cancer. *Can. Res.* 50 : 7415-7421
- Rhodes D., Klug A. (1993) Zinc Fingers. *Scientific American* février : 56-65
- Rio M.C., Bellocq J.P., Gairard B., Rasmussen U.B., Krust A., Koehl C., Calderoli H., Schiff V., Renaud R., Chambon P. (1987) Specific expression of the pS2 gene in subclasses of breast cancers in comparison with expression of the estrogen and progesterone receptors and the oncogene ERBB2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 9243-9247

Roy D., Liehr J.G. (1988a) Temporary decrease in renal quinone reductase activity induced by chronic administration of estradiol to male Syrian hamsters. *J. Biol. Chem.* 263 : 3646-3651

Roy D., Liehr J.G. (1988b) Characterization of drug metabolism enzymes in estrogen-induced kidney tumors in male Syrian hamsters. *Can. Res.* 48 : 5726-5729

Roy D., Liehr J.G. (1989) Changes in activities of free radical detoxifying enzymes in kidneys of male Syrian hamsters treated with estradiol. *Can. Res.* 49 : 1475-1480

Rushmore T.H., Morton M.R., Pickett C.B. (1991) The antioxidant response element. *J. Biol. Chem.* 266 : 11632-11639

Segura-Aguilar J., Cortès-Vizcaino V., Llombart-Bosch A., Ernster L., Monsalve E., Romero F.J. (1990) The levels of quinone reductases, superoxide dismutase and glutathione-related enzymatic activities in diethylstilbestrol-induced carcinogenesis in the kidney of male Syrian golden hamsters. *Carcinogenesis* 11 : 1727-1732

Sager R. (1989) The tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science* 246 : 1406-1411

Savlov E.D., Wittliff J.L., Hilf R., Hall T.C. (1974) Correlations between certain biochemical properties of breast cancer and response to therapy: A preliminary report. *Cancer* 33 : 303-309

Schimke R.T. (1984) Gene amplification, drug resistance, and cancer. *Can. Res.* 44 : 1735-1742

Schreck R., Albermann K., Baeuerle P.A. (1992) Nuclear factor NF- κ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radical Res. Commun.* 17 : 221-237

Schuh T.J., Mueller G.C. (1993) Estrogen receptor-dependent formation of two distinct multiprotein complexes on the human *pS2* gene regulatory segment. *Receptor* 3 : 125-143

Selivanova G., Wiman K.G. (1995) p53: a cell cycle regulator activated by DNA damage. *Adv. Can. Res.* 66 : 143-181

Sheikh M.S., Shao Z.M., Hussain A., Fontana J.A. (1993) The *p53*-binding protein *mdm-2* gene is differentially expressed in human breast carcinoma. *Can. Res.* 53 : 3226-3228

Shimamura A., Fisher D.E. (1996) p53 in life and death. Clin. Can. Res. 2 : 435-440

Siiteri P.K., MacDonald P.C. (1973) Role of extraglandular estrogen in human endocrinology. In: Greiger S.R., Astwood F.B., Greep R. eds. Handbook of physiology. Washington, D.C.: American Physiological Survey. 615-629

Smith M.L., Chen I.T., Zhan Q., Bae I., Chen C.Y., Gilmer T.M., Kastan M.B., O'Connor P.M., Fornace A.J. (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. Science 266 : 1376-1380

Soule H.D., Vazquez J., Long A., Albert S., et Brennan M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J. Natl. Cancer Inst. 51 : 1409-1416

Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98 : 503-517

Spicer L.J., Hammond J.M. (1989) Regulation of ovarian function by catecholestrogens: current concepts. J. Steroid Biochem. 33 : 489-501

Stoppa-Lyonnet D., Blandy C., Eisinger F. (1997) Cancer du sein : Évaluer le risque. La Recherche 294 : 72-76

Stryer L. (1988) Biochemistry. 3rd edition Freeman and co. New-York p.615

Sun Y. (1990) Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. Free Rad. Biol. Med. 8 : 583-599

Swaneck G.E., Fishman J. (1988) Covalent binding of the endogeneous estrogen 16 α -hydroxyestrone to estradiol receptor in human breast cancer cells: characterization and intranuclear localization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 7831-7835

Swaneck G.E., Fishman J. (1991) Effects of estrogens on MCF-7 cells: positive or negative regulation by the nature of the ligand-receptor complex. Biochem. Biophys. Res. Commun. 174 : 276-281

Szepietowski P., Perucca-Lostanlen D., Gaudray P. (1991) Amplification, proto-oncogènes et cancers humains. Médecine/Sciences 7 : 14-21

Telang N.T., Suto A., Wong G.Y., Osborne M.P., Bradlow L.H. (1992) Induction by estrogen metabolite 16 α -hydroxyestrone of genotoxic damage and aberrant proliferation in mouse mammary epithelial cells. J. Natl. Can. Inst. 84 : 634-638

Tlsty T.D., Brown P.C., Schimke R.T. (1984) UV radiation facilitates methotrexate resistance and amplification of the dihydrofolate reductase gene in cultured 3T6 mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* 4 : 1050-1056

Tlsty T.D., Margolin B.H., Lum K. (1989) Differences in the rates of gene amplification in nontumorigenic and tumorigenic cell lines as measured by Luria-Delbrück fluctuation analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 9441-9445

Tora L., White J., Brou C., Tasset D., Webster N., Scheer E., Chambon P. (1989) The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59 : 477-487

Troll W., Wiesner R. (1985) The role of oxygen radicals as a possible mechanism of tumor promotion. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25 : 509-528

Tsai M.J., O'Malley B.W. (1994) Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63 : 451-486

Wahl G.M. (1989) The importance of circular DNA in mammalian gene amplification. *Can. Res.* 49 : 1333-1340

Westley B., May F.E.B., Brown A.M.C., Krust A., Chambon P., Lippman M.E., Rochefort H. (1984) Effects of antiestrogens on the estrogen-regulated pS2 RNA

and the 52- and 160-kilodalton proteins in MCF-7 cells and two tamoxifen-resistant sublines. *J. Biol. Chem.* 259 : 10030-10035

Winstanley J., Cooke T., George W.D., Murray G., Holt S., Croton R., Griffiths K., Nicholson R. (1991) The long term prognostic significance of estrogen receptor analysis in early carcinoma of the breast. *Brit. J. Can.* 64 : 99-101

Wooster R., Neuhausen S.L., Mangion J., Quirk Y., Ford D., Collins N., Nguyen K., Seal S., Trun T., Averill D., Fields P., Marshall G., Narod S., Lenoir G.M., Lynd H., Feunteun J., Devilee P., Cornelisse C.J., Menko F.H., Daly P.A., Orniston W., McManus R., Pye C., Lewis C.M., Cannon-Albright L.A., Peto J., Ponder B.A.J., Skolnick M.H., Easton F.N., Douglas F., Goldgar D.E., Stratton M.R. (1994) Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265 : 2088-2090

Yager J.D., Liehr J.G. (1990) Molecular mechanism of estrogen carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36 : 203-232

Yang J.K., Masters J.N., Attardi G. (1984) Human dihydrofolate reductase gene organization. *J. Mol. Biol.* 176 : 169-187

Yin Y., Tainsky M.A., Bischoff F.Z., Strong L.C., Wahl G.M. (1992) Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* 70 : 937-948

Yu S.C., Fishman J. (1985) Interaction of histones with estrogens: covalent adduct formation with 16 α -hydroxyestrone. *Biochemistry* 24 : 8017-8021

Ziliacus J., Wright A.P.H., Carlstedt-Duke J., Gustafsson J.A. (1995) Structural determinants of DNA binding specificity by steroid receptors. *Mol. Endocrinol.* 9 : 389-400